

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efecto hipotensor del Ap<sub>4</sub>A en un modelo murino de  
glaucoma**

Hypotensive effect of Ap<sub>4</sub>A in a murine model of glaucoma

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Begoña Fonseca Vázquez**

DIRECTORES

**Jesús J. Pintor Just**  
**Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez**  
**Alejandro Martínez Águila**  
**María Rosa Gómez Villafuertes**

Madrid

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Óptica y Optometría**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV**



***Efecto hipotensor del Ap<sub>4</sub>A en un modelo murino de glaucoma***

***Hypotensive effect of Ap<sub>4</sub>A in a murine model of glaucoma***

Memoria para optar al grado de doctor con mención internacional presentada  
por:

**Begoña Fonseca Vázquez**

Bajo la dirección del doctor (In memoriam)

**Prof. D. Jesús J. Pintor Just**

Y los doctores:

**Prof. D. Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez**

**D. Alejandro Martínez Águila**

**Prof. D<sup>a</sup>. María Rosa Gómez Villafuertes**

**Madrid, 2019**



**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Óptica y Optometría**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV**



***Efecto hipotensor del  $Ap_4A$  en un modelo murino de  
glaucoma***

***Hypotensive effect of  $Ap_4A$  in a murine model of glaucoma***

**TESIS DOCTORAL**

**Begoña Fonseca Vázquez**

**Madrid, 2019**





UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. Begoña Fonseca Vázquez

con número de DNI/NIE/Pasaporte 02668599R, estudiante en el Programa  
de Doctorado Óptica Optometría y Visión,  
de la Facultad de \_\_\_\_\_ de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

Efecto hipotensor del Ap4A en un modelo murino de glaucoma

y dirigida por: J. Gonzalo Carracedo Rodríguez, Alejandro Martínez Águila y Mª Rosa Gómez Villafra  
Villafuentes

### DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 21 de JUNIO de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



El Dr. Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez, Profesor contratado doctor del departamento de Óptica II de la Facultad de Óptica y Optometría de la Universidad Complutense de Madrid, el Dr. Alejandro Martínez Águila, responsable del departamento de I+D de la empresa Avizor S.A y la Dra. M<sup>º</sup> Rosa Gómez Villafuertes, Profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid.

**CERTIFICAN:**

Que D<sup>ña</sup>. Begoña Fonseca Vázquez, Graduada y Máster en Óptica, Optometría y Visión por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Óptica y Optometría de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado "*Efecto hipotensor del Ap<sub>4</sub>A en un modelo murino de glaucoma*" "*Hypotensive effect of Ap<sub>4</sub>A in a murine model of glaucoma*" como Tesis Doctoral cumpliendo las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor con mención internacional por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, junio de 2019.

**Vº Bº DIRECTORES**

Dr. J. Gonzalo Carracedo Rodríguez



Dr. Alejandro Martínez Águila



Dra M<sup>º</sup> Rosa Gómez Villafuertes







*En la vida no existen cosas que temer, sino cosas por comprender.*

*Marie Skłodowska.*



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ADP</b>	Adenosina 5'-difosfato
<b>Ap<sub>n</sub>A</b>	Diadenosina polifosfatos
<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	P1, P4-Di-(adenosina-5') tetrafosfato
<b>AR-C</b>	[[5-(2,8-Dimetil-5 <i>H</i> -dibenzo[ <i>a,d</i> ]cicloheptano-5-yl)-3,4-dihidro-2-oxo-4-tioxo-1(2 <i>H</i> )-pirimidinil]metil]- <i>N</i> -2 <i>H</i> -tetrazol-5-yl-2-furancarboxamida]
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARPE-19</b>	Células del epitelio pigmentario de la retina humana
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-trifosfato
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración de calcio citosólico libre
<b>Ct</b>	Ciclo umbral o “cycle threshold”
<b>dTNPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>EC50</b>	Concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>Fura-2 AM</b>	Fura-2-acetoximetil éster
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
<b>HBSS</b>	Hank's balanced salt solution, solución salina de Hank balanceada
<b>IC50</b>	Concentración de inhibidor que produce el 50% del efecto máximo
<b>NDS</b>	<i>Normal donkey serum</i> , suero de burro normal.

<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFA</b>	p-formaldehído
<b>PIO</b>	Presión intraocular
<b>PPADS</b>	Piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-ácido disulfónico
<b>Q-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
<b>RB-2</b>	Reactivo azul 2
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>MRS2179</b>	2'-deoxy-N6-metiladenosina-3'-5'-bifosfato
<b>MRS2578</b>	1,4 -Di [3-(3-isotiocianatofenil)tioureido]butano
<b>NPE</b>	Células de epitelio ciliar no pigmentado
<b>P1</b>	Receptores purinérgicos de adenosinas
<b>P2</b>	Receptores purinérgicos de nucleótidos y dinucleótidos
<b>P2X</b>	Receptores purinérgicos de nucleótidos y dinucleótidos ionotrópicos
<b>P2Y</b>	Receptores purinérgicos de nucleótidos y dinucleótidos metabotrópicos
<b>UDP</b>	Uridina-5'-difosfato
<b>UTP</b>	Uridina-5' -trifosfato

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>1. EL OJO .....</b>	<b>7</b>
1.1 Descripción de las estructuras oculares.....	7
1.2 Procesos ciliares, humor acuoso y presión intraocular .....	9
1.2.1 <i>Los procesos ciliares</i> .....	9
1.2.2 <i>El humor acuoso, producción y drenaje</i> .....	11
1.2.3 La presión intraocular .....	15
1.3 Retina .....	16
<b>2. GLAUCOMA.....</b>	<b>20</b>
2.1 Descripción.....	20
2.2 Diagnóstico.....	21
2.3 Tipos de glaucoma .....	22
2.4 Genética del glaucoma.....	25
2.5 Tratamientos para el glaucoma .....	26
2.5.1 Estructuras oculares involucradas en la penetración de los fármacos aplicados tópicamente .....	29
2.6 Modelos animales en la investigación del glaucoma .....	30
2.6.1 Modelo murino de glaucoma: el DBA/2J .....	34
<b>3. NUCLEÓTIDOS, DINUCLEÓTIDOS Y RECEPTORES PURINÉRGICOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 Los nucleótidos .....	37
3.2 Receptores purinérgicos .....	40
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
<b>1. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>56</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>58</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>1. MATERIALES.....</b>	<b>61</b>
1.1 Reactivos .....	61
1.2 Equipos, instrumentos y materiales .....	62
1.3 Medios y tampones.....	63
1.4 Material biológico. ....	64
1.4.1 Animales de experimentación .....	64
1.4.2 Cultivo celular.....	66
1.5 Programas y herramientas informáticas.....	67

<b>2. MÉTODOS .....</b>	<b>68</b>
2.1 Medidas de presión intraocular .....	68
2.1.1 Monitorización de la evolución de la presión intraocular .....	69
2.1.2 Monitorización de la presión intraocular durante la evolución de la patología y la aplicación de tratamiento .....	70
2.2 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS EN RATONES.....	70
2.2.1 Estudio del efecto de la instilación tópica del Ap <sub>4</sub> A a corto y largo plazo.....	71
2.2.2 Dosis respuesta del Ap <sub>4</sub> A.....	71
2.2.3 Relación de los receptores purinérgicos y la presión intraocular.....	71
2.3 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN RATONES.....	72
2.3.1 Obtención de la muestra .....	72
2.3.2 Determinación de la concentración y del grado de pureza del ARN extraído.....	73
2.3.3 Reacción de la transcriptasa inversa (RT) .....	73
2.3.4 Preamplificación por PCR a tiempo real .....	74
2.3.5 Amplificación por PCR a tiempo real .....	75
2.3.6 PCR cuantitativa en tiempo real .....	75
2.4 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	79
2.4.1 Obtención de las secciones de los procesos ciliares.....	80
2.4.2 Inmunofluorescencia del tejido.....	81
2.4.3 Procesado de las imágenes.....	82
2.5 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	82
2.5.1 Estudio de la liberación de calcio al medio intracelular por la activación del Ap <sub>4</sub> A de receptores P2Y.....	83
2.5.2 Estudio de la liberación de calcio al medio intracelular en presencia de antagonistas de receptores P2Y.....	84
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	85
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>89</b>
<b>Objetivo 1: Describir la progresión de la presión intraocular en los animales glaucomatosos DBA/2J.....</b>	<b>89</b>
1.1 Cambios en la presión intraocular relacionados con la edad y con el desarrollo de la patología .....	89
<b>Objetivo 2: describir y demostrar la presencia de receptores purinérgicos de estudio en los procesos ciliares del modelo animal glaucomatoso DBA/2J .....</b>	<b>90</b>
2.1 Medidas de expresión del ARN mensajero de los receptores purinérgicos P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> y P2Y <sub>6</sub> . .....	91
2.2 Inmunohistoquímica de los receptores P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> y P2Y <sub>6</sub> . .....	91
<b>Objetivo 3: Describir la implicación de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> con la evolución de la patología.....</b>	<b>93</b>
3.1 EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS CON LA EVOLUCIÓN DE LA PATOLOGÍA .....	93
3.1.1 Receptor P2Y <sub>1</sub> .....	94
3.1.2 Receptor P2Y <sub>2</sub> .....	95
3.1.3 Receptor P2Y <sub>6</sub> .....	96

3.2 INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN DE LA PATOLOGÍA.....	97
3.2.1 Inmunohistoquímica del receptor P2Y <sub>1</sub> .....	98
3.4.2 Inmunohistoquímica del receptor P2Y <sub>2</sub> .....	100
3.4.2 Inmunohistoquímica del receptor P2Y <sub>6</sub> .....	102
<b>Objetivo 4: Comprobar el efecto del Ap<sub>4</sub>A como agente hipotensor .....</b>	<b>104</b>
4.1 Dosis respuesta del Ap <sub>4</sub> A .....	104
4.2 Estudio del efecto del dinucleótido Ap <sub>4</sub> A sobre la PIO con respecto al tiempo. ....	105
4.3 Estudio del efecto de los antagonistas de los receptores P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> y P2Y <sub>6</sub> . ....	106
4.4 Efecto de la instilación tópica del Ap <sub>4</sub> A combinado con fármacos comerciales.....	110
<b>Objetivo 5: Comprobar el efecto del Ap<sub>4</sub>A en células microgliales (BV-2) y en las células del EPR humano (ARPE-19). ....</b>	<b>112</b>
5.1 EXPERIMENTOS EN CÉLULAS MICROGLIALES BV-2.....	112
5.1.1 Ensayo de Fura-2 AM de liberación de calcio al medio intracelular en presencia del Ap <sub>4</sub> A.....	113
5.2 EXPERIMENTOS EN CÉLULAS ARPE-19 .....	114
5.2.1 Dosis respuesta del Ap <sub>4</sub> A en las células ARPE-19 .....	114
5.2.2 Experimentos de antagonistas de los receptores P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> y P2Y <sub>6</sub> en las células ARPE-19 .....	115
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>119</b>
<b>1. PROGRESIÓN DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN LOS ANIMALES GLAUCOMATOSOS DBA/2J 120</b>	
<b>2. PRESENCIA DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> Y P2Y<sub>6</sub> EN LOS PROCESOS CILIARES DEL MODELO ANIMAL GLAUCOMATOSO DBA/2J.....</b>	<b>121</b>
<b>3. IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> Y P2Y<sub>6</sub> CON LA EVOLUCIÓN DE LA PATOLOGÍA. ....</b>	<b>122</b>
<b>4. EFECTO DEL Ap<sub>4</sub>A COMO AGENTE HIPOTENSOR EN UN MODELO DE GLAUCOMA.....</b>	<b>123</b>
<b>5. EFECTO DEL Ap<sub>4</sub>A EN CÉLULAS MICROGLIALES: BV-2 Y EN LAS CÉLULAS DEL EPR HUMANO: ARPE-19. ....</b>	<b>127</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	¡Error! Marcador no definido.
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>139</b>
<b>CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA .....</b>	<b>159</b>





# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las principales estructuras del ojo.....	9
Figura 2. Corte histológico del ojo donde se muestran, entre otras estructuras, el cuerpo ciliar y el ángulo iridocorneal.....	10
Figura 3. Esquema del sistema de drenaje del humor acuoso en el interior del ojo.....	14
Figura 4. Esquema Imagen de las capas de la retina. ....	17
Figura 5. Esquema simplificado de la clasificación del glaucoma .....	23
Figura 6. Evolución del polo anterior del ratón DBA/2J con la edad. ....	35
Figura 7. Estructura de la molécula de diadenosina tetrafosfato.....	38
Figura 8. Esquema representativo de los receptores P2X .....	42
Figura 9. Esquema representativo de la activación de un receptor P2Y .....	46
Figura 10. Acciones del dinucleótido Ap <sub>4</sub> A sobre los receptores purinérgicos. ....	51
Figura 11. Imagen de los animales de experimentación. ....	65
Figura 12. Cámara de sedación ratones.....	68
Figura 13. Equipo de anestesia superficial con isoflurano.....	69
Figura 14. Representación esquemática de la amplificación que tiene lugar durante la q-PCR. ....	76
Figura 15. Esquema de los sucesos que tienen lugar durante el desarrollo de una Q-PCR. ....	77
Figura 16. Medidas de la PIO en los ratones DBA/2J y C57BL/6J desde los 3 meses hasta los 12 meses de edad.....	90
Figura 17. Imagen del gel resultante de la RT-PCR de los receptores P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> y P2Y <sub>6</sub> . ....	91
Figura 18. Panel expresión DBA 3 meses .....	92
Figura 19. Representación de la evolución temporal de la expresión del receptor P2Y <sub>1</sub> en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J. ....	94
Figura 20. Representación de la evolución temporal de la expresión del receptor P2Y <sub>2</sub> en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J.....	95
Figura 21. Representación de la evolución temporal de la expresión del receptor P2Y <sub>6</sub> en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J.....	96
Figura 22. Cuantificación de la fluorescencia del receptor P2Y <sub>1</sub> en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.....	98
Figura 23. Representación de la distribución celular del receptor P2Y <sub>1</sub> en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J.....	99
Figura 24. Cuantificación de la fluorescencia del receptor P2Y <sub>2</sub> en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.....	100
Figura 25. Representación de la distribución celular del receptor P2Y <sub>2</sub> en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J.....	101
Figura 26. Cuantificación de la fluorescencia del receptor P2Y <sub>6</sub> en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.....	102
Figura 27. Representación de la distribución celular del receptor P2Y <sub>6</sub> en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J.....	103
Figura 28. La gráfica muestra la curva de la dosis-respuesta del Ap <sub>4</sub> A sobre la presión intraocular. ....	105

Figura 29. Representación del efecto del Ap <sub>4</sub> A (100 μM, 2 μL) a lo largo de 6 horas en ambos tipos de animales.....	106
Figura 30. Efecto en los ratones C57BL/6J de los antagonistas selectivos de los receptores P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> y P2Y <sub>6</sub> .....	107
Figura 31. Efecto en los ratones DBA de los antagonistas selectivos de los receptores P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> y P2Y <sub>6</sub> .....	108
Figura 32. Evolución de la PIO desde el quinto al noveno mes de vida de los ratones DBA/2J y los ratones C56BL/6J.....	109
Figura 33. Representación de la PIO (% del control) al instilar Ap <sub>4</sub> A con Timoftol .....	111
Figura 34. Representación de la PIO (% del control) al instilar Ap <sub>4</sub> A junto con Alphagan® .....	111
Figura 35. Fluorescencia obtenida en respuesta al Ap <sub>4</sub> A 3 mM durante un periodo de 0 a 300 segundos.....	113
Figura 36. Representación gráfica de la curva de la dosis respuesta del Ap <sub>4</sub> A en las células microgliales BV-2. ....	114
Figura 37. Representación gráfica de la dosis respuesta del Ap <sub>4</sub> A en las células ARPE-19. ....	115
Figura 38. Efecto Ap <sub>4</sub> A del en la liberación de Calcio al medio extracelular en presencia de antagonistas selectivos.....	116

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los receptores P2X.....	44
Tabla 2. Clasificación de los receptores P2Y.....	48
Tabla 3. Representación de los receptores purinérgicos P2Y de estudio en la presente tesis expresados en el globo ocular.....	52
Tabla 4. Reactivos Generales .....	61
Tabla 5. Agonistas, antagonistas e inhibidores.....	62
Tabla 6. Equipos, instrumentos y materiales.....	63
Tabla 7. Medios y tampones .....	64
Tabla 8. Tamaño muestral de animales en función de los experimentos realizados .....	66
Tabla 9. Programas y herramientas informáticas .....	67
Tabla 10. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia del tejido.....	81
Tabla 11. Valores de PIO en ambas cepas de ratón, con respecto al tiempo, expresados en mmHg	105
Tabla 12. Variación de los valores de PIO en los ratones C57BL/6J expresados en mmHg.....	108
Tabla 13. Variación de los valores de PIO en los ratones DBA/2J expresados en mmHg.....	108
Tabla 14. Valores de la variación de la PIO en los animales de experimentación con y sin tratamiento, expresados en mmHg.....	110
Tabla 15. Variación de la PIO en los ratones DBA/2J cuando aplicamos Alphagan.....	112
Tabla 16. Variación de la PIO en los ratones DBA/2J cuando aplicamos tópicamente Timoftol.....	112



Resumen/Summary



## RESUMEN

El glaucoma es una patología neurodegenerativa que cursa principalmente con un incremento en la presión intraocular (PIO) y se considera la segunda causa de ceguera en el mundo. Es un tipo de neuropatía óptica progresiva en la que se produce una degeneración progresiva de las células ganglionares de la retina y sus axones, lo que se traduce en un cambio en la apariencia del disco óptico y un patrón concomitante de pérdida de visión.

Existen diferentes modelos animales para el estudio de la patología del glaucoma. Entre estos se encuentra el ratón glaucomatoso DBA/2J el cual desarrolla de manera natural una enfermedad similar al glaucoma humano, viéndose incrementada su PIO alrededor de los 6 meses como consecuencia del acúmulo de pigmento en la malla trabecular debido a una dispersión pigmentaria de iris. Este modelo ha sido utilizado con anterioridad para investigar los posibles fallos en los mecanismos que se pueden producir en las células ganglionares durante la patología.

Ha sido descrito que el dinucleótido  $Ap_4A$  tiene un importante papel en el ojo y es capaz de activar los receptores purinérgicos los cuales están presentes en el globo ocular, en estructuras como la malla trabecular, los procesos ciliares y el epitelio pigmentado de la retina, entre otras. Se sabe también que el  $Ap_4A$  está involucrado en procesos como la secreción lagrimal, la cicatrización del epitelio corneal, la regulación de la presión intraocular y que tiene un efecto neuroprotector sobre las terminales nerviosas del cuerpo ciliar. Los niveles de este dinucleótido aparecen anormalmente elevados en pacientes con glaucoma (15 veces más que los pacientes sanos).

El objetivo principal del presente trabajo ha sido evaluar la relación entre el  $Ap_4A$  y los receptores purinérgicos  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  y  $P2Y_6$  en un modelo murino de glaucoma. Más concretamente poder describir la evolución de la patología en relación con estos receptores, conocer el efecto del  $Ap_4A$  sobre la presión



intraocular en estos animales y también poder dar un nuevo enfoque sobre este dinucleótido en relación con el glaucoma y la neuroprotección.

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos, se llevaron a cabo diferentes técnicas en los ratones DBA/2J y C57BL/6J (glaucomatosos y control) como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o PCR cuantitativa e inmunohistoquímica, con las que pudimos determinar la presencia de estos receptores, su evolución con el tiempo y por tanto con el avance de la patología. Tomando medidas de PIO, monitorizamos los animales permitiéndonos ver el aumento de PIO que se produce con la edad de los mismos y diversos fenómenos como la disminución de la PIO, dosis y tiempo dependiente del  $Ap_4A$ , que al instilar de manera continuada el dinucleótido conseguimos prevenir la subida de la PIO de los ratones glaucomatosos y que, además, cuando lo combinamos con fármacos comerciales, la reducción de la misma se ve incrementada con respecto a cuando se instilan solos. Mediante los ensayos de medidas de liberación de calcio al medio intracelular por fluorescencia (Fura-2 AM), pudimos observar un efecto sobre células microgliales y del epitelio pigmentario de la retina (EPR).

Como conclusión de esta tesis doctoral, podemos decir que el dinucleótido  $Ap_4A$  es un buen candidato para el tratamiento del glaucoma gracias a su efecto hipotensor y a su acción neuroprotectora, debido a que el glaucoma es una patología multifactorial y, por lo tanto, debemos manejar diferentes estrategias para el tratamiento de la misma.

## SUMMARY

Glaucoma is a neurodegenerative pathology, which is related to an increase of intraocular pressure (IOP) and it is considered as the second cause of blindness worldwide. It causes progressive optic neuropathy that leads into a progressive degeneration of the ganglion retinal cells and their axons producing changes on the optic nerve and a concomitant visual loss pattern.

There are different animal models that allow a great study of glaucoma. Among these models, the glaucomatous DBA/2J mice suffer a rise in IOP around the sixth month of life as a result of iris depigmentation dispersion syndrome. This murine model of glaucoma has been used recently in order to widen the knowledge about the failures on the mechanisms that take place in the ganglion cells.

It has been described that the dinucleotide  $Ap_4A$  plays an important role in the eye and is able to activate the purinergic receptors. These receptors are present in different ocular structures such as the trabecular meshwork, the ciliary processes and the pigmented epithelium of the retina. It is known that  $Ap_4A$  is involved in many physiological mechanisms of the eye: increasing tear secretion, accelerating corneal wound healing, intraocular pressure regulation and it has also a neuroprotective effect on the nerve ending of the ciliary processes.

The aim of this thesis has been to establish a relationship between the dinucleotide  $Ap_4A$  and the purinergic receptors  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  y  $P2Y_6$  in a murine model of glaucoma, widening the knowledge of the pathology. More specifically, to describe the changes of these receptors with the progress of the pathology, to know the effect of the  $Ap_4A$  in the glaucomatous DBA/2J mice and to give a new vision about the dinucleotide and the neuroprotective effect in the pathology of glaucoma.

With the purpose of achieving the proposed aims, different techniques have been carried out, like the quantitative polymerase chain reaction or qPCR,

immunohistochemistry experiments, intraocular pressure measurements, or Fura-2 AM assays. These experiments have been performed on DBA/2J and C57BL/6J mice and on BV2 microglial cells and ARPE-19 cells.

We have been able to see the changes of mRNA and of protein in the purinergic receptors by making qPCR and immunohistochemistry techniques, and with these experiments, we have demonstrated that the expression of some P2Y receptors, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, and P2Y<sub>6</sub>, changes during the development of the glaucomatous pathology in this mouse model. The prevalence of the P2Y<sub>2</sub> receptor between 9 and 12 months of age, together with the rise in Ap<sub>4</sub>A concentration, may be a contributing factor that helps explain why the pressure is abnormally elevated when the pathology is fully established.

The effect of the topical application of Ap<sub>4</sub>A on IOP showed interesting results: by one hand, the short term experiments showed a reduction on IOP of 30% approximately in the glaucomatous mice and that the purinergic receptors P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, and P2Y<sub>6</sub> can be related to these results; on the other hand, the long term effect of the topical application of Ap<sub>4</sub>A delayed the IOP natural rise in the DBA/2J, slowing the progression of the pathology down.

When analysing the functional Ca<sup>2+</sup> intracellular dye assay Fura-2 AM we observed that the Ap<sub>4</sub>A produced stimulation on both BV2-microglial and ARPE-19 cells. In addition, we could see that part of the results was caused by the effect of the dinucleotide on the purinergic receptors P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, and P2Y<sub>6</sub>. Further experiments on these cells are needed to have more information and to be able to make an appropriate conclusion of the obtained results.

We can conclude that the dinucleotide Ap<sub>4</sub>A is a good candidate for the treatment of glaucoma due to its hypotensive and neuroprotective characteristics. Glaucoma is a multifactorial disease and we should be able to manage more than one strategy for its treatment.

# Introducción



# INTRODUCCIÓN

## 1. EL OJO

El ojo es el órgano de la visión. Está altamente especializado en el proceso de la fotorrecepción y la fototransducción, que consiste en captar la luz recibida por el ojo y que se transmite a través de las diferentes estructuras oculares y poder transformarla en una señal que va desde el nervio óptico hasta el córtex cerebral donde se traduce la señal recibida en forma de imagen (Forrester et al., 2016). Para que todo este proceso se pueda llevar a cabo tiene que haber un equilibrio entre las diferentes estructuras del ojo y un correcto funcionamiento del sistema nervioso.

Como norma general se considera que el ojo es una esfera de aproximadamente 25 milímetros de diámetro, un volumen de 6,5 mililitros y una longitud axial de 24 milímetros. Además, el resto de estructuras del ojo tales como los párpados, pestañas, músculos extraoculares o glándula lagrimal son necesarias para el proceso de la visión (Levin and Adler, 2011).

### 1.1 Descripción de las estructuras oculares

Anatómicamente el ojo se puede dividir en tres capas o túnica fundamentales:

- **La capa fibrosa o corneoescleral:** es la capa más externa y resistente de las capas del ojo. Recubre y protege al resto de los tejidos oculares. Está formada por la esclera, la cual confiere la resistencia adecuada al globo ocular y por la córnea, que es la responsable de la protección del globo ocular a posibles daños biomecánicos e infecciones y también es responsable del efecto refractivo en el ojo debido a su transparencia conferida por la avascularidad (Kim et al., 2014, Meekins et al., 2016, Forrester et al., 2016) Estas dos estructuras (esclera y córnea) están unidas

entre sí por el limbo esclerocorneal, que aporta nutrientes a la córnea periférica y ayuda a la cicatrización corneal en su parte externa. En su parte interna se encuentran alojadas las estructuras implicadas en las vías de drenaje del humor acuoso (McMenamin, 1991, Forrester et al., 2016).

- **La túnica vascular:** se encuentra entre la túnica fibrosa más externa y la sensorial más interna. Está compuesta por la coroides que se extiende desde la *ora serrata* hasta la inserción del nervio óptico y está muy vascularizada, nutriendo las capas más externas de la retina y de la úvea, la cual está a su vez formada por el cuerpo ciliar y el iris. Éste es un disco de tejido pigmentado contráctil que es capaz de regular la luz que pasa a través de su apertura central (la pupila) y que divide el globo ocular en la cámara anterior y la cámara posterior (Davis-Silberman and Ashery-Padan, 2008, Forrester et al., 2016). El cuerpo ciliar alberga los procesos ciliares, los cuales son los responsables de la producción del humor acuoso (Levin and Adler, 2011).
- **La capa neural o sensorial:** Esta capa está formada por la retina neurosensorial y el epitelio pigmentado de la retina (EPR). Su principal función es convertir la radiación procedente de la luz que ha pasado a través de las estructuras transparentes que forman el sistema óptico, en impulsos nerviosos que son transmitidos al cerebro para su procesamiento y análisis. (Levin and Adler, 2011, Forrester et al., 2016).

En el interior de estas capas están los dos medios acuosos que sustentan y proporcionan tonicidad al globo ocular: el humor acuoso y el humor vítreo. Además de las estructuras ya mencionadas, en esta parte interna y dividiendo el ojo en cámara anterior y cámara posterior, encontramos el cristalino que es una lente biconvexa, avascular y transparente que puede modificar su curvatura durante el proceso de acomodación (Forrester et al., 2016).

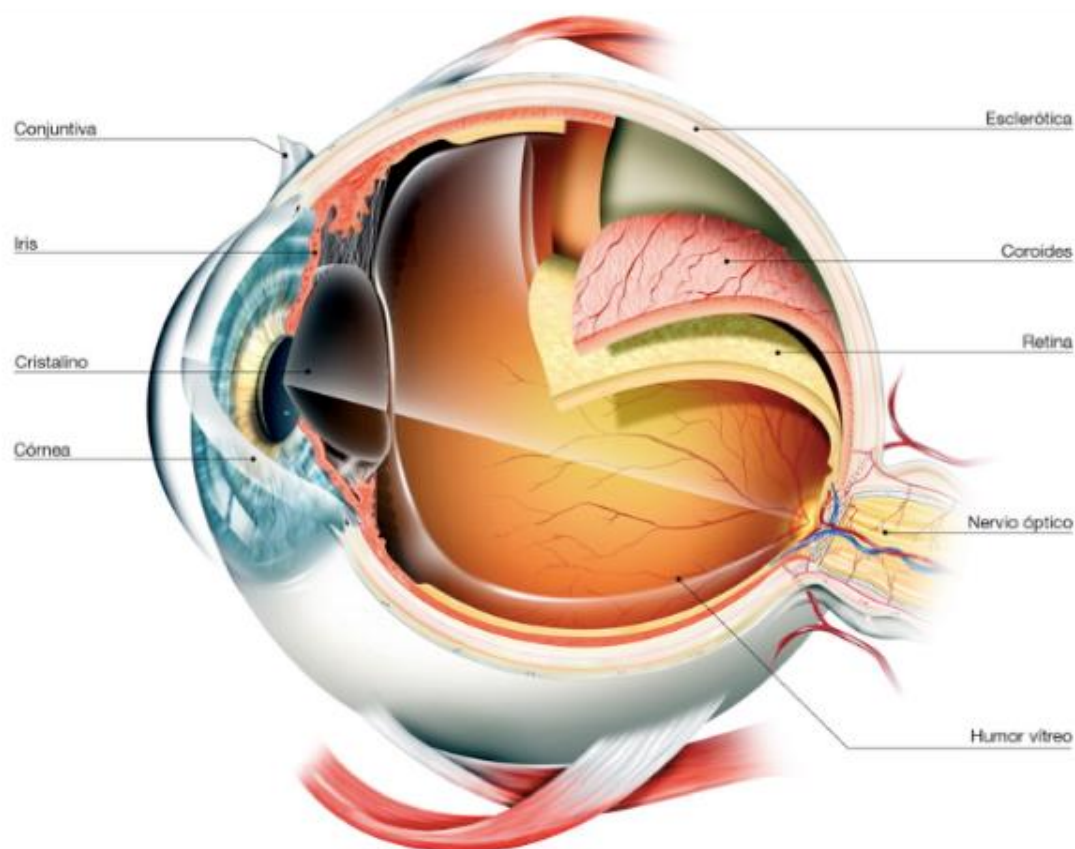


Figura 1. Esquema de las principales estructuras del ojo.

Modificada del Dr. Soler. URL: <https://drsoler.com/problema-de-vision/el-ojo-humano>.

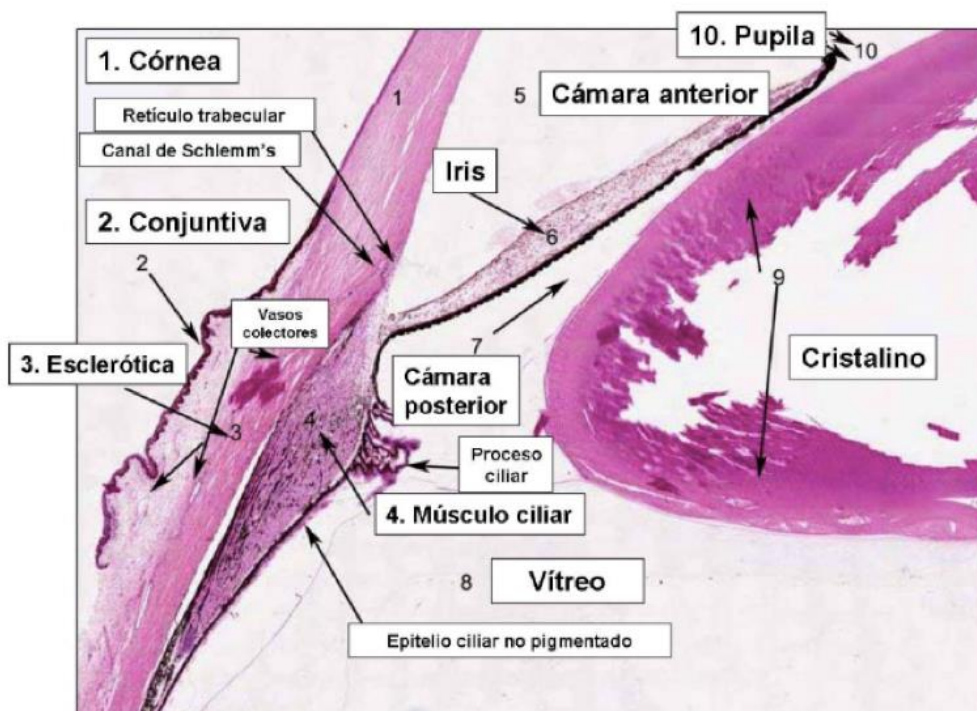
## 1.2 Procesos ciliares, humor acuoso y presión intraocular

### 1.2.1 Los procesos ciliares

El cuerpo ciliar es un anillo de 5-6 mm de ancho que va desde el espolón escleral hasta la *ora serrata*. El anillo es más ancho en la zona temporal del ojo que en la nasal y está dividido en dos zonas, la *pars plicata* (anterior) y la *pars plana* (posterior). Se podría decir que el cuerpo ciliar tiene forma triangular y que su base está en contacto con la cámara anterior y el ápice está en contacto con la coroides. Es un tejido multicelular formado por una bicapa de células neuroepiteliales secretoras, un estroma subyacente que contiene vasos sanguíneos y células de músculo liso postsináptico inervadas por fibras nerviosas simpáticas y adrenérgicas. La *pars plicata* mide 2 mm de ancho y tiene 70 pliegues conocidos como procesos ciliares, los cuales tienen 0.5 mm de ancho y de 0.5 mm a 0.8 mm de alto



compuestos por tejido vascular conectivo, recubierto por un neuroepitelio cúbico (Hara et al., 1977, Levin and Adler, 2011, Forrester et al., 2016). El cuerpo ciliar es una estructura muy vascularizada y se sabe que funcionalmente interviene en los procesos de contracción del cristalino para la acomodación, en la producción de glicosaminoglicanos o glicoproteínas del cristalino, en la secreción de moléculas antioxidantes, enzimas y neuropéptidos (Bishop et al., 2002). También está implicado en la producción del colágeno vítreo y en la producción y drenaje del humor acuoso (Forrester et al., 2016)



**Figura 2.** Corte histológico del ojo donde se muestran, entre otras estructuras, el cuerpo ciliar y el ángulo iridocorneal.

URL [https://nanopdf.com/download/9-organizacion-y-diversidad-de-la-biosfera-5afa2bb1c5553\\_pdf](https://nanopdf.com/download/9-organizacion-y-diversidad-de-la-biosfera-5afa2bb1c5553_pdf).

Histológicamente los procesos ciliares se dividen en epitelio ciliar (pigmentado y no pigmentado), el estroma y el tejido muscular. Las células del epitelio no pigmentado (NPE) se encuentran en la parte interna de cada proceso y sus ápices están conectados por complejos de unión como lo son las uniones estrechas o "*tight junctions*". Están en contacto directo con el humor acuoso y la capa de células del epitelio ciliar pigmentado (PE). El epitelio pigmentado se encuentra en la parte externa, entre el NPE y el estroma ciliar. (Figura 2)

Embriológicamente, el epitelio no pigmentado corresponde a la continuación de la retina neurosensorial. Posee numerosas interdigitaciones en las superficies laterales, característico de los epitelios secretores relacionados con transporte de fluidos y numerosas invaginaciones en la membrana basal. Las células del NPE son cilíndricas y poseen un metabolismo muy activo, con un gran número de mitocondrias y retículos endoplasmáticos rugosos. Están involucradas en procesos de transporte dependientes de energía, y presentan una mayor actividad de la adenilato ciclasa y de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa (Ghosh et al., 1991, Forrester et al., 2016).

El epitelio pigmentado de los procesos ciliares corresponde a la continuación del epitelio pigmentado de la retina. Tiene una gran superficie de contacto con el estroma y por tanto, con el plasma sanguíneo. Las células son cúbicas y contienen gran cantidad de pigmento, un gran número de interdigitaciones y uniones comunicantes (*gap junctions*) en los bordes laterales de las células y en la zona apical, permitiendo el intercambio de iones y moléculas entre ambas capas celulares (Levin and Adler, 2011, Forrester et al., 2016).

### **1.2.2 El humor acuoso, producción y drenaje**

El humor acuoso es un fluido transparente que es secretado por los procesos ciliares, concretamente por las células del epitelio ciliar no pigmentado (NPE).

En el ojo hay aproximadamente 250  $\mu\text{L}$  de humor acuoso y se producen unos 2-4  $\mu\text{L}$  por minuto (McLaren, 2009). Aunque el contenido del humor acuoso procede de los capilares fenestrados presentes en el estroma de los procesos ciliares como hemos mencionado anteriormente, su composición es diferente al plasma sanguíneo. Está compuesto por electrolitos (iones orgánicos e inorgánicos), glutatión, urea, aminoácidos, proteínas, las cuales son unas 200 veces menos que el plasma sanguíneo oxígeno, dióxido de carbono y agua (Dickinson et al., 1968, Krause and Raunio, 1969). La concentración de ácido ascórbico encontrada en el humor acuoso es de entre 20 y 50 veces más que la que se encuentra en el plasma

sanguíneo, y se ha podido demostrar que esta concentración está elevada es para proteger a las estructuras oculares que recubre, de la radiación de luz ultravioleta y de los daños que esta puede producir sobre ellas. (Reddy et al., 1998). También posee cantidades más elevadas del ion cloruro y de lactato el cual interviene en la actividad glucolítica del cristalino y de la córnea (Barany and Kinsey, 1949, Brown et al., 1986).

Se considera un componente importante del sistema óptico/refractivo del ojo debido a su transparencia y debido a que posee un índice de refracción de 1.33. Contribuye al mantenimiento de un correcto metabolismo ocular, a facilitar el aporte de oxígeno y nutrientes necesarios para las estructuras avasculares que están bañadas por el mismo (como la córnea o el cristalino), y favorece la eliminación de los productos de desecho del metabolismo. Puede actuar también como transportador no específico de citoquinas, inmunoglobulinas y neurotransmisores. Sin embargo, aunque todas estas funciones son fundamentales, la propiedad más importante que tiene el humor acuoso es la de regular la presión intraocular del ojo, la cual es controlada por el balance entre la producción y el drenaje del mismo. Debido a este proceso, el globo ocular mantiene su configuración esférica y sus propiedades ópticas (Civan et al., 1997, Díez and Pujol, 2004, Forrester et al., 2016). El equilibrio que se produce entre la formación y la evacuación de humor acuoso para mantener la presión intraocular está regulado, entre otros, por la presencia en el mismo de ácido hialurónico que es capaz de disminuir la resistencia al drenaje a nivel de la malla trabecular (Fautsch and Johnson, 2006) y por la presencia de nucleótidos y dinucleótidos extracelulares (Mitchell et al., 1998, Pintor, 2003).

La formación del humor acuoso es un proceso complejo que se produce en cuatro fases. En la primera fase, el flujo sanguíneo llega a los capilares fenestrados de los procesos ciliares. A partir del plasma procedente de los capilares, las macromoléculas se filtran desde los capilares fenestrados hacia el estroma, traspasando las células del epitelio pigmentado que están unidas exclusivamente por las uniones de la *zónula adherens* o las uniones en banda, llegando a la cámara

posterior. Una vez aquí, son acompañados por un flujo pasivo de agua que sigue el gradiente osmótico (Brubaker, 1991).

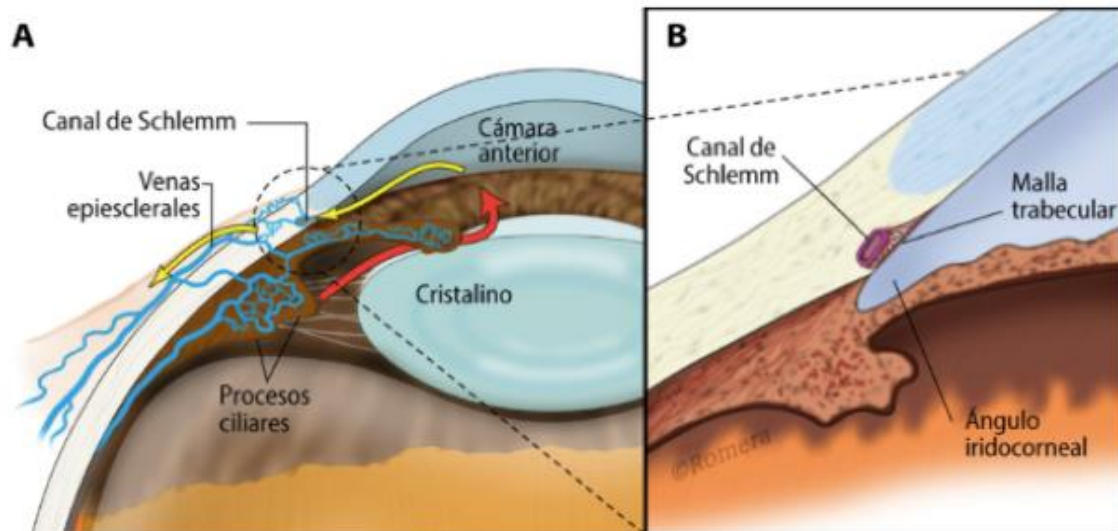
El movimiento de solutos a través del epitelio ciliar puede llevarse a cabo a través de tres procesos fisiológicos interdependientes:

Uno es mediante difusión, que consiste es un movimiento pasivo de solutos a través de las membranas del epitelio ciliar como respuesta a un gradiente de concentración, siendo las sustancias con un coeficiente de liposolubilidad elevado las que atraviesan con mayor facilidad la membrana celular (Civan and Macknight, 2004).

El segundo proceso es la ultrafiltración, que supone un movimiento pasivo de agua y sustancias solubles en agua a través de las membranas celulares como resultado de la fuerza hidrostática y se produce como resultado de la diferencia de presión entre la presión arterial y la intraocular. En este proceso se produce el mayor flujo de plasma sanguíneo a través del endotelio de los capilares fenestrados hacia el estroma ciliar. (Bill, 1973, Do and Civan, 2004).

El tercer proceso consiste en la secreción activa de los solutos de ultrafiltrado hacia la cámara posterior, en contra de gradiente y con un consumo de energía. A este proceso es el que se le considera el responsable de la formación del humor acuoso en sí (Cole, 1977, Goel et al., 2010, Levin and Adler, 2011).

El humor acuoso es drenado fundamentalmente mediante mecanismos de flujo pasivo a través de una red de vénulas libres de sangre llamadas plexo angular acuoso. El drenaje del humor acuoso es un proceso que ocurre desde la cámara posterior, donde ha sido producido, hasta llegar a la cámara anterior atravesando la pupila. Una vez en cámara anterior, será drenado a través de la vía convencional o también llamada vía trabecular o a través de la vía no convencional o uveo-escleral (Brubaker et al., 2001) (Figura 3)



**Figura 3.** Esquema del sistema de drenaje del humor acuoso en el interior del ojo.

En la imagen A podemos ver como el humor acuoso se produce en los procesos ciliares, pasa a través de la pupila hasta la cámara anterior y se elimina a través de la malla trabecular y el canal de Schlemm. En la imagen B se muestra el ángulo iridocorneal y el canal de Schlemm ampliado. Imagen del Dr. Romera modificada de la realizada para la monografía “cirugía microincisional del glaucoma” presentada en la SEO 2016.

La vía convencional supone aproximadamente el 80% de la evacuación del humor acuoso en el ser humano (Levin and Adler, 2011). El drenaje por esta vía se inicia en el ángulo iridocorneal, donde el humor acuoso fluye a través de la malla trabecular, hasta alcanzar el canal de Schlemm y llenar los canales colectores. Dentro de las partes de la malla trabecular, la parte más externa es la malla cribiforme, que se sitúa por debajo de la pared interna del canal de Schlemm. La conformación de esta malla cribiforme consiste en células trabeculares enredadas en una matriz extracelular de colágeno, fibras y proteoglicanos, y se cree que es el punto principal de resistencia al flujo de salida del humor acuoso. A medida que el músculo ciliar se contrae y se mueve hacia el interior, la malla trabecular tridimensional se amplía y aumenta la cantidad de espacios libres que hay en la malla cribiforme ampliando el canal de Schlemm. Estos dos hechos, contribuyen al aumento del flujo de salida del humor acuoso (Barany, 1966, Rohen et al., 1967, Abu-Hassan et al., 2014, Forrester et al., 2016). Una vez alcanzado el canal de Schlemm el humor acuoso atraviesa la pared interna del endotelio del canal por dos rutas: una paracelular, donde el humor acuoso fluye a través de los espacios intercelulares del endotelio del canal, y otra ruta, la transendotelial donde se

producen invaginaciones y poros en las células endoteliales que facilitan el drenaje mediante vacuolas gigantes. Esta vía es dependiente de la presión intraocular, porque las estructuras formadas se incrementan proporcionalmente con el aumento de presión y desaparecen cuando disminuye. Aun así, a altas presiones el drenaje disminuye debido a la compresión de la red trabecular y del canal de Schlemm (Bill, 1973, Grierson and Lee, 1978). El proceso finaliza cuando el humor acuoso atraviesa el canal de Schlemm y entra en los canales colectores, donde será drenado directamente hacia las venas episclerales e intraesclerales.

Por su parte, la vía no convencional o uveoescleral representa la cantidad de humor acuoso que una vez ha entrado en la malla trabecular escapa del flujo trabecular y se dirige hacia la parte posterior de la cámara anterior donde es filtrado a través de la porosidad del tejido conectivo laxo en el cuerpo ciliar. El humor acuoso se almacena en el espacio uveo-escleral, un espacio virtual entre el cuerpo ciliar posterior, la coroides anterior y la esclera; desde aquí, el humor acuoso llega al espacio supracoroidal posterior. Esta es una vía minoritaria, que supone entre el 3 y el 10 % del drenaje y es independiente de la PIO (Jackson et al., 2007).

### **1.2.3 La presión intraocular**

Se denomina presión intraocular a la fuerza que soportan los tejidos intraoculares. Esta presión se mantiene estable gracias a la existencia de un equilibrio entre la producción y el drenaje de humor acuoso (Grant, 1958). Se considera de manera global que los valores fisiológicos de PIO varían entre 11 y 21 mmHg (milímetros de mercurio) y que el riesgo de padecer glaucoma por hipertensión empieza con valores superiores a los 21 mmHg. Aun así, es importante tener en cuenta diferentes aspectos a evaluar, como el espesor corneal que limita los valores de esta medida, el fondo de ojo y el estado del nervio óptico y hacer campos visuales para poder determinar la existencia de otros factores asociados a la patología. Se puede padecer glaucoma sin tener una PIO elevada y al

revés, tener una PIO elevada sin sufrir ninguna consecuencia por ello (Casson, 2012).

Uno de los métodos más utilizados para la determinación de la PIO es la tonometría. Los tonómetros pueden ser de dos tipos: de aplanación y de indentación. El de aplanación, mide la fuerza aplicada necesaria, por unidad de superficie, para aplanar la córnea; y el de indentación se basa en el principio de que un vástago indenta más un ojo blando que uno duro. La determinación de la PIO en humanos proporciona valores promedio de 15-16 mmHg variando en función del tonómetro usado y del espesor corneal, siendo el de referencia en la práctica clínica el de Goldmann (Goldmann, 1950).

Una presión intraocular elevada es uno de los riesgos principales para desarrollar glaucoma, sin embargo es la parte de la patología más fácil de controlar y modificar.

Dicha presión intraocular no es estable a lo largo del día. Existen variaciones de la misma durante el día en ojos normales, siendo mucho mayores en ojos glaucomatosos (Asrani et al., 2000). La PIO se puede ver afectada por los ritmos circadianos, alcanzando valores máximos a primera hora de la mañana y mínimos a última hora del día (Reiss et al., 1984).

Además, puede estar modificada por la presión de las venas episclerales, y también por el efecto de las hormonas o de los nervios craneales V y VII ((Perkins, 1957, Podos et al., 1968, Vajaranant et al., 2010).

### 1.3 Retina

La cámara posterior está delimitada anteriormente por la parte dorsal del iris y posteriormente por el vítreo. Es en esta cámara donde se hayan los procesos ciliares, responsables de la producción del humor acuoso. La capa neural o neurosensorial y el epitelio pigmentado de la retina (EPR) constituyen el límite posterior de la cámara vítrea. En la retina es donde tiene lugar la conversión de la información recibida del entorno en forma de impulso nervioso para su posterior decodificación y análisis en la corteza cerebral (Forrester et al., 2016).



La retina está formada por ocho capas, entre las cuales hay diferentes tipos de células como células neuronales, pericitos, células gliales, vasculares y microglía (Masland, 2001). Todas estas capas están organizadas en capas nucleares y plexiformes donde se establecen las conexiones sinápticas:

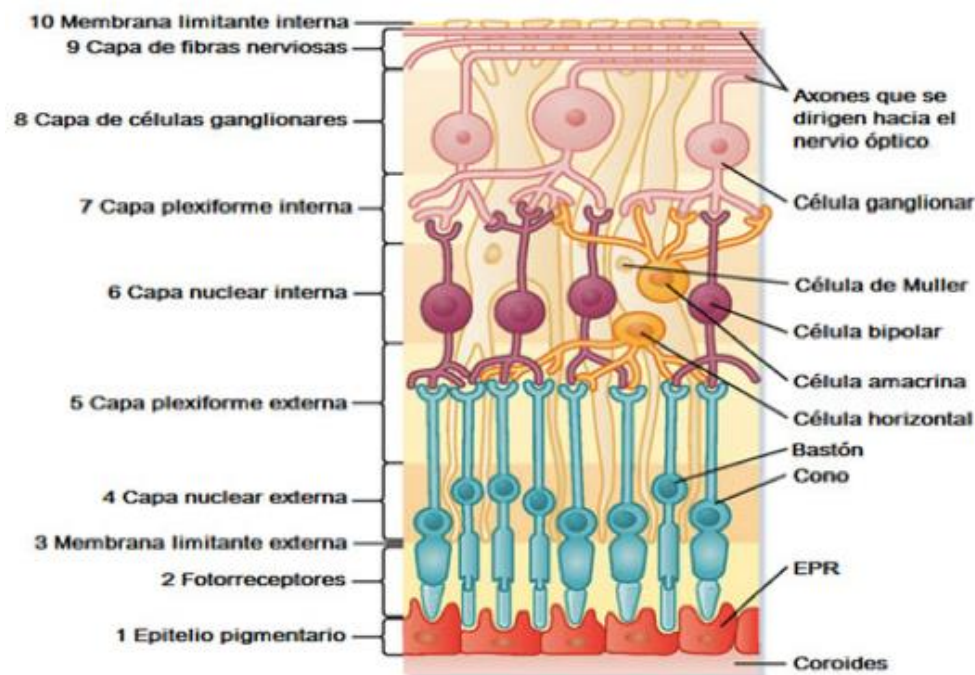


Figura 4. Esquema Imagen de las capas de la retina.

URL: <https://inof.es/diagnostico-y-tratamiento-de-enfermedades-de-la-macula>

- **Epitelio pigmentado de la retina (EPR):** Es la capa más externa de la retina, formada por células epiteliales que contienen una gran concentración de melanina, las cuales son responsables de los fenómenos de absorción y reflexión de la luz en el interior del globo ocular. Estructuralmente limita con la membrana de Bruch de la coroides. Esta capa juega un papel fundamental en el desarrollo de la retina ocupándose de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (Bosch et al., 1993), aportándoles oxígeno y vitaminas implicadas en los procesos de fototransducción como el retinol y los retinoides. Además, está implicado en el transporte selectivo de iones en los segmentos externos de los fotorreceptores (Bok, 1993).



- **Capa de los segmentos de los fotorreceptores (FR):** Formada por los segmentos externos e internos de los fotorreceptores.
  - **Membrana limitante externa (Stefulj et al.):** Está conformada por las uniones entre los segmentos internos de los fotorreceptores y las prolongaciones de las células de Müller. Se sitúa entre los núcleos y los segmentos de los fotorreceptores.
  - **Capa nuclear externa (CNE):** Esta capa se compone de los cuerpos celulares de los conos y los bastones.
  - **Capa plexiforme externa (CPE):** Está constituida además de por los contactos sinápticos entre los axones de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares, por las prolongaciones de las células horizontales y células interplexiformes.
  - **Capa nuclear interna (Zamecnik):** En esta capa aparecen los núcleos de las células horizontales, las células amacrinas, las células interplexiformes, las células de Müller y los somas de las células bipolares.
  - **Capa plexiforme interna (CPI):** Está formada por los axones de las células bipolares y las prolongaciones de las células amacrinas e interplexiformes.
  - **Capa de células ganglionares de la retina (CCGR):** Principalmente compuesta por las células ganglionares, aunque en esta capa también se encuentran las células amacrinas desplazadas y las células gliales (los astrocitos).
  - **Capa de fibras nerviosas de la retina (CFN):** Esta capa se compone únicamente por los axones de las células ganglionares de la retina.
- Membrana limitante interna (Khor et al.):** En esta capa encontramos los terminales de las células de Müller (Forrester et al., 2016).

Además de las células anteriormente mencionadas, en la retina aparecen las células de la microglía las cuales tienen una función principalmente fagocitadora. Estas células forman parte del sistema nervioso central y se caracterizan por sus núcleos pequeños y alargados y por poseer una forma particular del cuerpo celular (Vilhardt, 2005). Se encuentran localizadas en toda

la retina, pero es en las capas plexiforme externa e interna donde se encuentra una mayor densidad de células de la microglía (Provis et al., 1995). Hay que señalar que las células microgliales aparecen siempre junto a los vasos sanguíneos y alrededor del nervio óptico (Neufeld, 1999). La función de “arrastre” o fagocitosis se puede llevar a cabo debido a su capacidad para adoptar una forma redonda y corpuscular en forma de gránulos que son capaces de emigrar mediante movimientos ameboides con la parte de desecho ya apresada (Aloisi, 2001). Este cambio de morfología puede estar causado por la presencia de un patógeno, cuerpos extraños, restos de las células de alrededor o bien en una situación de hipoxia, trauma o inflamación. (Raibon et al., 2002, Kaur et al., 2013). Una vez que han podido fagocitar el material de desecho, la mayoría de las células de la microglía vuelven a su posición de origen recuperando su forma en reposo, siendo ésta en forma de dendrita (Jonas et al., 2012). Estas células han adquirido recientemente un interés especial porque, aunque no se puede evitar que las células neuronales mueran, sí pueden ayudar a que sobrevivan otras ocupándose del entorno dañino de las mismas (Toku et al., 1998).

## 2. GLAUCOMA

### 2.1 Descripción

Actualmente el glaucoma se define como una neuropatía óptica crónica, que está presente cuando en al menos uno de los dos ojos existen defectos funcionales y estructurales (pérdida de visión y pérdida de campo visual). Además, este daño tiene que estar acompañado de pérdida de fibras nerviosas tanto en retina como en el nervio óptico (Foster et al., 2002, Quigley, 2011).

De acuerdo a la organización mundial de la salud, el glaucoma es la principal causa de ceguera irreversible en el mundo (Pascolini and Mariotti, 2012).

En 2013 se estimó que el número de personas de entre 40 y 80 años afectadas por glaucoma era de 63,4 millones y se cree que la cantidad de afectados irá en aumento y se verá incrementada hasta los 76 millones en 2020 y unos 112 millones en 2040 (Tham et al., 2014).

La prevalencia del glaucoma registrada anteriormente estaba estimada en 60 millones de casos en todo el mundo, algunos sin diagnosticar pero con sospechas, de los cuales 8,4 millones eran ciegos de forma bilateral (Quigley and Broman, 2006, Quigley, 2011).

La patología aparece predominantemente en personas mayores y va progresando poco a poco. Aun así, puede ocurrir que existan problemas de regulación de flujo del humor acuoso en edades tempranas (Grover et al., 2015).

Los factores asociados al incremento del riesgo de padecer glaucoma son una elevada presión intraocular (PIO), una edad avanzada, un historial familiar de padecer glaucoma, ascendencia africana o asiática, ser miope y tener una córnea central delgada (Alsbirk, 1976, Sommer and Tielsch, 1996, Landers et al., 2002, Heijl et al., 2009). Una PIO elevada está considerada el mayor factor de riesgo para padecerlo y es el único que puede ser modificado para frenar o retardar la pérdida de visión. Incluso para los pacientes que tienen PIO baja pero pierden visión debido

al glaucoma, se recomiendan terapias enfocadas al control de PIO. (Lee and Goldberg, 2011, Grieshaber and Flammer, 2010).

Si la presión intraocular se mantiene elevada durante un largo periodo de tiempo, además de que se pueda producir daño en la arteria ciliar, existe también un daño mecánico del nervio óptico en la parte que se dirige a las áreas centrales de la visión (Brusini and Johnson, 2007). Se ha observado en los pacientes con glaucoma una atrofia peripapilar de la coroides que está asociada con una disminución o pérdida total de las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR) y también con una disminución o ausencia de los fotorreceptores de la retina (Jonas, 1992). Debido al importante daño que se produce a nivel de la retina, provocando la pérdida de células ganglionares y por consiguiente un cambio en la disposición del nervio óptico, el sistema nervioso central que forma parte de la retina es capaz de desarrollar un mecanismo para hacer frente a la pérdida de células (Liu and Hong, 2003) y se ha podido determinar que la microglía está activada en la condición de glaucoma (Provis et al., 1995). Es por esto que actualmente se considera que sería de gran utilidad desarrollar algoritmos de tratamientos dirigido a la neuroprotección de la retina para prevenir la muerte de las células ganglionares que se produce en el disco óptico de un ojo glaucomatoso (Wang et al., 2016).

## 2.2 Diagnóstico

En las últimas décadas se ha hecho hincapié en la importancia de un diagnóstico temprano de la patología del glaucoma. La mayoría de los tipos de glaucoma cursan sin dolor y no se aprecia una pérdida de campo visual en los estadios más tempranos, así que el paciente que lo padece no se da cuenta hasta que está en una etapa avanzada de la enfermedad (Chauhan et al., 2013, Yu et al., 2016). Es esencial realizar una observación minuciosa del fondo de ojo mediante oftalmoscopia o tomografía de coherencia óptica (OCT) para poder evaluar la cabeza del nervio óptico y de las fibras nerviosas de la retina. Estas dos

herramientas son bastante útiles, además de para un diagnóstico temprano, para los seguimientos posteriores del paciente (Belghith et al., 2016).

La perimetría o campo visual se realiza como prueba diagnóstica y también se emplea para hacer un seguimiento y poder asegurar y conocer el daño del nervio óptico, así como para localizar la pérdida de campo de visión. Aunque es una prueba subjetiva y por lo tanto, se pueden perder muchas fibras nerviosas antes de que se detecte una alteración en el campo visual, nos muestra el defecto que afecta al paciente (Musch et al., 2009, Kerrigan-Baumrind et al., 2000).

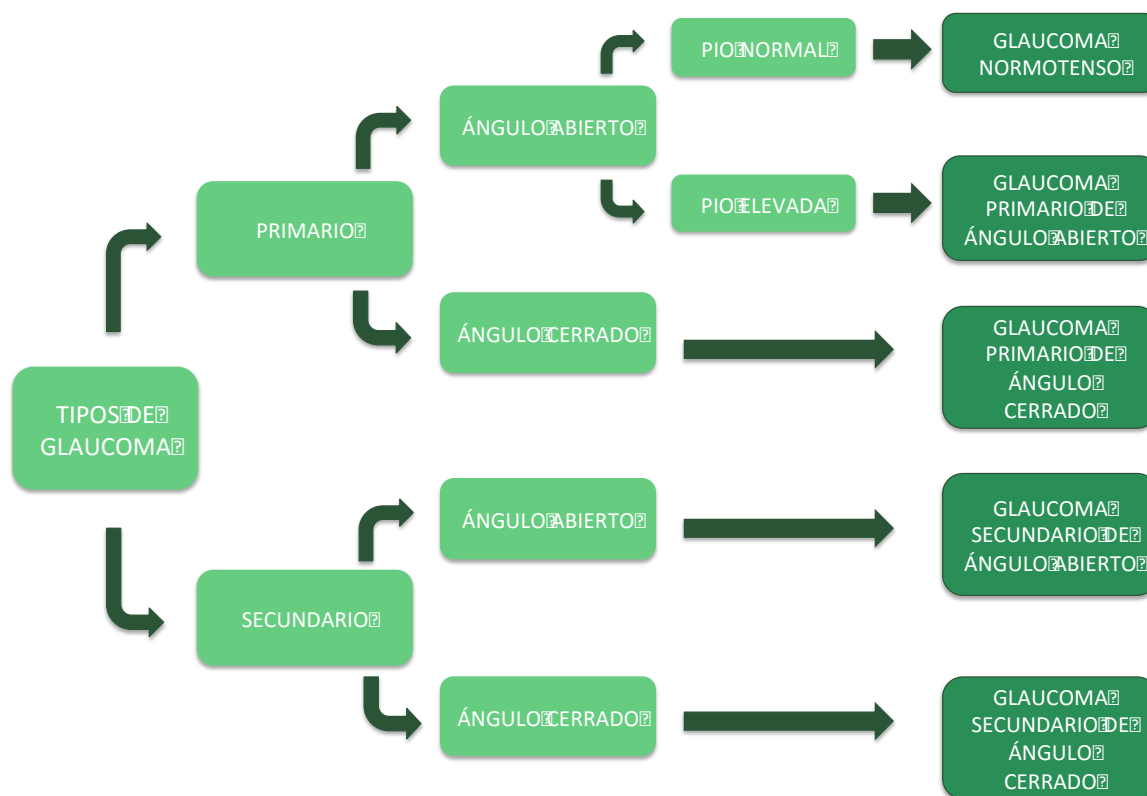
La otra prueba fundamental empleada para diagnosticar y hacer el seguimiento del glaucoma es la tonometría. Aunque no se puede aplicar este criterio a todos los pacientes de glaucoma debido a que algunos cursan con una presión intraocular dentro de los valores normales, la mayoría de los pacientes que acuden a consulta tienen la PIO elevada. Además, es el único factor que puede ser controlado y que compromete la visión del paciente y el desarrollo de la patología (Heijl et al., 2002).

Conociendo la afectación de otras funciones visuales que puede llegar a provocar el glaucoma, podría ser interesante incluir en los exámenes de diagnóstico y seguimiento otras pruebas como las de visión a color, conocer la adaptación a la oscuridad y la sensibilidad al contraste las cuales siempre están disminuidas en estos pacientes. Sin embargo, estas pruebas no están incluidas en las rutinas habituales de examen para personas con glaucoma ya que existe una variabilidad en las respuestas a estas pruebas entre sujetos y no se considera que sigan un patrón determinado para establecer una relación resultado-estado (Jonas et al., 2017).

## 2.3 Tipos de glaucoma

La clasificación del glaucoma se puede categorizar o bien por si es primario o secundario, o bien por si es de ángulo abierto o de ángulo cerrado, aunque ambas

clasificaciones son compatibles entre sí. Es importante destacar que todos los tipos de glaucoma tienen en común una pérdida de células de la retina.



**Figura 5. Esquema simplificado de la clasificación del glaucoma**

El tipo de glaucoma más común es el primario de ángulo abierto, y la edad, la raza o la etnia son los riesgos principales para padecerlo. Debido a que la esperanza de vida de la población a nivel mundial está incrementándose con el tiempo, se ha calculado que en el año 2020 habrá en torno a 11 millones de personas que serán ciegas como consecuencia del glaucoma. Se estima que en 2050 esta cifra se va a duplicar (Quigley and Broman, 2006). En este tipo de glaucoma el humor acuoso tiene un tránsito descontrolado y libre en el canal de Schlemm y en la malla trabecular.

En el glaucoma primario de ángulo cerrado la parte periférica del iris está en contacto con la malla trabecular y la córnea periférica, bloqueando así el flujo del

humor acuoso. A pesar de que este tipo de glaucoma es menos prevalente que el primario de ángulo abierto, causa más ceguera irreversible en las personas que lo padecen (Foster et al., 2000). Aparece normalmente de manera bilateral en los pacientes, lo cual hace que sea el que peor pronóstico tiene (Tham et al., 2014). Es el tipo de glaucoma más prevalente entre personas asiáticas, concretamente en las regiones de India y China (He et al., 2006).

Existen pacientes que tienen glaucoma normotenso, lo que quiere decir que su presión intraocular no está elevada. Se considera un tipo de glaucoma primario de ángulo abierto, aunque se ha generado cierta controversia con esta clasificación (Lestak et al., 2014). La resistencia al flujo del humor acuoso puede estar ligeramente elevada, aunque por norma general, se encuentra en un nivel normal (Drance et al., 2001).

Cuando el glaucoma es de tipo congénito, el flujo en la malla trabecular está reducido en la mayoría de los casos por una falta de desarrollo en la misma y el canal de Schlemm durante el desarrollo embrionario. El aumento de la presión intraocular en niños menores de 2 años causa un crecimiento del ojo, que se conoce por bftalmos (Ko et al., 2015).

El glaucoma secundario de ángulo abierto cursa con una PIO elevada debido a que hay una resistencia al paso del humor acuoso a través de la malla trabecular y del canal de Schlemm. Bajo estas condiciones se engloba el glaucoma asociado al síndrome de dispersión pigmentaria y el glaucoma exfoliativo (Ritch, 1994, Moroi et al., 2003). El síndrome de dispersión pigmentaria, como su nombre indica, causa la dispersión del pigmento del iris hacia la cámara anterior del ojo. El pigmento se acumula en las estructuras de drenaje, lo que provoca una elevación de la presión intraocular y finalmente el glaucoma (Scheie and Cameron, 1981). El glaucoma causado por el síndrome de dispersión pigmentaria representa entre el 1-1,5% de todos los glaucomas. Es más común en hombres que en mujeres, y existen varios estudios que prueban que tienen una línea directa de transmisión de padres a hijos, hasta en 4 generaciones (Moreno et al., 2014).

En el glaucoma secundario de ángulo cerrado el contacto iridocorneal es debido a que el iris es empujado debido a una neovascularización del iris o a uveítis (Aiello et al., 1994).

## 2.4 Genética del glaucoma

Se ha podido determinar que el glaucoma primario de ángulo abierto está asociado con una gran cantidad de genes: *CDKN2B-AS1*, *CAV1* and *CAV2*, *TMCO1*, *ABCA1*, *AFAP1*, *GAS7*, *TXNRD2*, *ATXN2*, la región intergénica del cromosoma 8q22, *SIX1* y *SIX6*. (Alward, 1998, Li et al., 2015, Bailey et al., 2016). Concretamente, la miociclina, la optineurina y el gen *WDR36* han sido asociados con el glaucoma en adultos, el gen *CYP1B1* al glaucoma en niños y jóvenes, y el gen *LOXL1* al glaucoma exfoliativo (Stoilov et al., 1997, Monemi et al., 2005, Springelkamp et al., 2015).

Las asociaciones entre el glaucoma y la genética varían en relación al grupo étnico de estudio. Por ejemplo, los alelos que están implicados en la susceptibilidad de padecer glaucoma en la población blanca europea no tienen ninguna asociación con los que están implicados en la población afro-americana (Khor et al., 2016).

Teniendo en cuenta los resultados de los estudios genéticos realizados, es importante conocer la historia familiar de glaucoma, ya que se verían incrementadas las posibilidades de la aparición de la patología teniendo un familiar de primer grado que haya padecido glaucoma (Jonas et al., 2017).

A pesar de los avances en el conocimiento de estos genes y de sus mutaciones y de la relación que tienen con el riesgo de padecer glaucoma, no se ha podido determinar realmente la contribución que tienen con la patogénesis del glaucoma (Jonas et al., 2017). Sin embargo, se tiene en consideración su relevancia y se espera poder utilizar estos genes relacionados con el glaucoma como diana para nuevos tratamientos (Wiggs and Pasquale, 2017).



## 2.5 Tratamientos para el glaucoma

Los tratamientos actuales para el glaucoma están enfocados principalmente en mantener la presión intraocular controlada, y a preservar la integridad del nervio óptico y por tanto prevenir cualquier daño neurodegenerativo que pueda causar pérdida de visión al paciente (Noecker, 2006, Parikh et al., 2008). Se manejan tres opciones fundamentales a nivel clínico para el tratamiento del glaucoma: el farmacológico, terapia con láser y la cirugía. Muchas veces, se combina el tratamiento farmacológico con el quirúrgico/láser (Roy Chowdhury et al., 2015).

El tratamiento más extendido y de primera opción es el farmacológico, mediante la aplicación tópica de fármacos, instilándolos directamente sobre la superficie ocular. Existe una gran diversidad de fármacos que se emplean actualmente para mantener la PIO controlada (Noecker, 2006).

- **Prostaglandinas, o análogos de las prostaglandinas (latanoprost, travoprost, tafluprost):** Son los fármacos de primera elección para el tratamiento. Son capaces de aumentar el drenaje uveoescleral del humor acuoso.
- **Agonistas de los receptores beta-adrenérgicos (timolol, betaxolol, levobunolol y carteolol):** Se utilizan como una alternativa a los análogos de las prostaglandinas. Disminuyen la producción de humor acuoso en los procesos ciliares hasta en un 50%.
- **Agonistas de los alpha2-adrenérgicos (brimonidina y aproclonidina):** Actúan mediante un mecanismo doble, disminuyendo la producción de humor acuoso y aumentando el drenaje de este a través de la malla trabecular.
- **Agentes mióticos o parasimpaticomiméticos (pilocarpina):** Son los que se han utilizado durante más tiempo. Provocan la contracción del músculo ciliar ensanchando la malla trabecular y permitiendo el paso del exceso de humor acuoso acumulado.

- **Inhibidores de las anhidrasas carbónicas (acetazolamida, bronzplamida y dorzolamida):** Son capaces de disminuir la secreción de humor acuoso, inhibiendo la actividad enzimática en el cuerpo ciliar.

Estos fármacos se pueden administrar durante el día o durante la noche en función de su forma de actuación. Los análogos de las prostaglandinas, los inhibidores de las anhidrasas carbónicas y los agentes mióticos pueden reducir la presión intraocular durante el día y la noche, mientras que los bloqueantes beta-adrenérgicos y los alfa-adrenérgicos son más efectivos sólo durante el día. Ambos grupos de fármacos se pueden combinar entre sí para un mejor efecto en el tratamiento (Noecker, 2006, Parikh et al., 2008).

El tratamiento enfocado a mantener los valores de la presión intraocular dentro de la normalidad debe ser analizado periódicamente para poder adecuar las dosis y los fármacos al estado del paciente.

A pesar de los beneficios en la regulación de la PIO en los pacientes con glaucoma, todos estos fármacos tienen efectos adversos bastante agudos:

- Los análogos de las prostaglandinas: pueden provocar exacerbación del asma, dolor muscular, infección respiratoria superior, o síntomas de resfriado. Además pueden producir pérdida de grasa orbital, oscurecimiento de la pigmentación del iris y pigmentación en la piel periocular (Ehongo and Bremer, 2007).
- Los agonistas de los receptores beta-adrenérgicos: se han asociado con arritmias, bradicardias, bajada de la tensión arterial, fallo cardíaco, depresión, insomnio y obstrucciones aéreas (Ehongo and Bremer, 2007).
- Los agonistas selectivos adrenérgicos alpha-2: se relacionan con reacciones alérgicas, sequedad bucal, fatiga, hipotensión y somnolencia.

- Los agonistas colinérgicos: pueden provocar mareo, dolor de cabeza, hipoglucemia, náuseas e incremento salivar y de sudoración (Beckers et al., 2008). Además, disminuyen la acomodación en pacientes menores de 45 años, y mantienen la pupila contraída, lo que provoca una disminución en la visión escotópica y reduce la agudeza visual en pacientes con cataratas (Cantor, 1989).
- Los inhibidores de anhidrasa carbónica pueden provocar reacciones alérgicas, sabor metálico, fatiga y trombocitopenia (Beckers et al., 2008).

Cuando el tratamiento farmacológico deja de ser efectivo o no es suficiente, en muchos pacientes, se complementa este tratamiento con cirugía. La terapia quirúrgica consiste en reducir la PIO modificando estructuras del ángulo de la cámara anterior y el iris, facilitando así el drenaje del humor acuoso. Se puede llevar a cabo mediante láseres, como el láser de argón, el Nd:Yag y el de diodo semiconductor. Para esto, se emplean diferentes técnicas: la trabeculectomía, en la que se extirpa una parte del trabéculo y del endotelio del canal de Schlemm creando una vía de salida para el humor acuoso, y la trabeculoplastia, en la que se crea una “lesión” mediante el uso de un láser y se facilita también la salida del humor acuoso (Threlkeld et al., 1996). La trabeculectomía es más efectiva que otras cirugías menos invasivas como la esclerotomía o la viscocanalostomía, pero tiene más riesgo de complicación (Lai et al., 2002). Otro procedimiento quirúrgico similar en la técnica de realización y en los efectos producidos a la trabeculectomía son los implantes de dispositivos de drenaje del humor acuoso. Estos dispositivos consisten en un tubo que se inserta en el espacio subconjuntival y consiguen un aumento del drenaje (Gedde et al., 2012).

Estos tratamientos son los más frecuentes, pero actualmente existen otro tipo de fármacos y de dispositivos en estudio que intentan mejorar la calidad del tratamiento, aunque muchos de estos tratamientos no evitan los efectos secundarios asociados a los fármacos convencionales.

Por un lado, se investiga sobre nuevos agentes para mejorar la eficacia de los fármacos ya existentes, como geles, liposomas etc. (Yadav et al., 2019). Por otro lado, los dispositivos más novedosos en la administración de fármacos son los insertados en la parte periocular (en forma de anillo o de matriz que va liberando los fármacos hacia el ojo), los tapones punctales o canaliculares, las lentes de contacto que eluyen de forma prolongada los fármacos hacia el ojo, las matrices bioadhesivas y los implantes que pueden ser subconjuntivales, de cámara anterior o intravítreos. Ninguno de ellos ha superado la fase 3 o la fase preclínica, así que no se encuentran en uso actualmente (Lin et al., 2017). Por último, se está evaluando el uso de una terapia celular con células de la malla trabecular (Zhu et al., 2017).

Entre los nuevos grupos farmacológicos para el tratamiento del glaucoma, se encuentran el empleo de cannabinoides (Jay and Green, 1983), los moduladores de citoesqueleto celular como el ácido etacrínico (Erickson-Lamy et al., 1992), el empleo de inhibidores de las Rho Kinasas (ROCK1 Y ROCK2)(Rao and Epstein, 2007), cuyo primer fármaco (Glanatec®) ya ha sido lanzado en Japón (Tanihara et al., 2016), los inhibidores de óxido nítrico (Neufeld et al., 2002), el empleo de la melatonina o de sus análogo 5-MCA-NAT y agomelatina (Crooke et al., 2012, Martinez-Aguila et al., 2013, Martinez-Aguila et al., 2016). Por último, mencionar el uso de nucleótidos y dinucleótidos como tratamiento eficaz para reducir la PIO (Guzman-Aranguez et al., 2013).

### **2.5.1 Estructuras oculares involucradas en la penetración de los fármacos aplicados tópicamente**

Para conocer mejor cómo actúan los fármacos instilados en el globo ocular para producir una reducción de la presión intraocular es interesante tener en cuenta ciertos aspectos de las estructuras y de los fluidos oculares implicados en el proceso de actuación del fármaco desde que toca la superficie ocular hasta que alcanza su objetivo o zona diana.

Este proceso se puede dividir en dos fases: la fase de penetración y la fase de salida. La cantidad de fármaco que puede atravesar la córnea durante la fase de

penetración está relacionada con la dinámica de los fluidos oculares y la permeabilidad de la córnea. La concentración de un fármaco en la córnea alcanza su pico máximo en unos pocos minutos y el fármaco sigue atravesando estructuras hasta alcanzar la cámara anterior. En condiciones normales, la llegada del fármaco al humor acuoso se regula por sí mismo y tarda hasta 2 horas en alcanzar su pico máximo. Si por el contrario la permeabilidad endotelial es alta, la concentración en el humor acuoso puede alcanzar su pico entre los 10 y los 20 minutos (Maurice, 1980).

Los fármacos que alcanzan el humor acuoso se mezclan con este por convección, haciendo que el fármaco pueda entrar en contacto con las diferentes estructuras de la cámara anterior como el iris, la malla trabecular, el cuerpo ciliar o el cristalino. El fármaco también puede ser absorbido por los vasos sanguíneos de la zona uveal anterior o por el cristalino, lo que hace que se pierda rápidamente parte de su efecto. Esta pérdida puede variar según el tipo de fármaco (Shell, 1982).

## **2.6 Modelos animales en la investigación del glaucoma**

Como se ha descrito en el apartado 1.2, la presión intraocular es uno de los factores de riesgo para desarrollar glaucoma. Es por esto que a nivel de investigación se han desarrollado diferentes modelos animales sobre los que poder trabajar y poder conocer los mecanismos de la patología y las posibles dianas terapéuticas. Estos modelos animales están generalmente manipulados para tener hipertensión ocular de manera reproducible y repetible. La mayoría de ellos desembocan en la inducción de una presión intraocular elevada crónica, incluso un daño o pérdida de la función visual. La complejidad de la patología y sus diferentes tipos de glaucoma hace que sean necesarios varios tipos de modelo de experimentación animal para poder tener una amplia gama de resultados que puedan correlacionarse con la patología en el ser humano (Struebing and Geisert, 2015).

A continuación, se describe brevemente los modelos y los métodos más empleados para producir el aumento de la PIO y su posterior estudio:

- **Reducción del drenaje del humor acuoso.** El drenaje puede bloquearse cauterizando dos o tres venas epiesclerales (Shareef et al., 1995, Mabuchi et al., 2003), inyectando solución salina hipertónica en las venas epiesclerales (Morrison et al., 1997) o realizando una fotocoagulación láser de las vías de drenaje de humor acuoso, malla trabecular, venas perilimbares y epiesclerales (WoldeMussie et al., 2001, Levkovitch-Verbin et al., 2002, Salinas-Navarro et al., 2009, Vidal-Sanz et al., 2012). Estos experimentos se han llevado a cabo en ratas. En ratón se han practicado las mismas técnicas de fotocoagulación en las diferentes vías mencionadas anteriormente (Aihara et al., 2003, Grozdanic et al., 2003, Salinas-Navarro et al., 2009, Gallego et al., 2012, Rojas et al., 2014).
- **Bloqueo del drenaje del humor acuoso a nivel de la malla trabecular.** Con este sistema se evita la manipulación del sistema vascular del ojo. Se puede realizar mediante la inyección de diferentes sustancias como microesferas de látex en la cámara anterior del ojo (Weber and Zelenak, 2001) o en combinación con hidroxipropilmetilcelulosa (Urcola et al., 2006, Sappington et al., 2010) lo que desemboca en un bloqueo de los canales de la malla trabecular en rata.
- **Aumento de la presión intraocular.** Para producir glaucoma crónico en conejos, se han practicado inyecciones subconjuntivales de una solución de fenol al 5% diluido en aceite de almendras. Estas inyecciones causan un aumento de la presión intraocular porque el fenol induce una escleritis vascular en las venas epiesclerales, aunque sin causar ningún daño en el ojo (Luntz et al., 1996). La administración sistémica mediante inyección del antígeno-S es capaz de simular un modelo de glaucoma uveítico (Mermoud et al., 1994). Realizar inyecciones en la cámara posterior en el ojo de conejo albino de la raza Nueva Zelanda con  $\alpha$ -quimiotripsina también puede provocar un glaucoma experimental mediante el aumento de la presión

intraocular (Triviño Casado, 1984). Pasados 40 días de la administración de la  $\alpha$ -quimiotripsina se puede observar una elevación de la presión intraocular. Al mantenerse tanto tiempo elevada se llega a producir un daño en la cabeza del nervio óptico (Fernandez-Durango et al., 1990). Las inyecciones de metilcelulosa al 2% en la cámara anterior del ojo de los conejos de la raza Nueva Zelanda también incrementan los valores de la presión intraocular, dando lugar en estos animales a un descenso de la densidad de células ganglionares y un incremento significativo de la densidad de células gliales (Manni et al., 1996). Por otro lado, una única inyección ácido hialurónico induce un aumento en la presión intraocular en ratas y este aumento se mantiene en el tiempo durante aproximadamente 8 días (Benozzi et al., 2002). Además estas inyecciones causan cambios funcionales e histológicos a nivel de retina, aumentando el daño del nervio óptico y de la capa de células ganglionares (Moreno et al., 2005).

En general, el modelo más empleado para investigar el glaucoma, especialmente testando fármacos para reducir la presión intraocular, han sido los modelos normotensos a los que se les ha inducido un aumento de la PIO (Gelatt and Mackay, 1998).

Se considera que el empleo de animales de mayor tamaño puede tener beneficios en cuanto a una mejor accesibilidad a las diferentes estructuras del ojo y a una mayor cantidad de tejido para su posterior análisis. Se han realizado diversos estudios en primates induciendo la elevación de la presión intraocular mediante coagulación láser de la malla trabecular (Gaasterland and Kupfer, 1974, Quigley, 1983) en modelos de glaucoma hereditario en perros y gatos (Wyman and Ketring, 1976, Zhan et al., 1992) y en ovejas y vaca mediante una inyección de esteroides para elevar la PIO (Gerometta et al., 2004, Gerometta et al., 2009).

Los conejos o casi cualquier otro animal, como ratones o ratas, pueden ser colocados en un cepo con la cabeza abajo en un ángulo de 80° con la horizontal. Esta posición es llamada posición de Trendelenburg (Meyer, 1885) y produce un

estasis venoso gravitacional que dificulta el drenaje del humor acuoso y aumenta la PIO (Langham and Taylor, 1960). Dado que esta posición es sencilla de realizar y claramente produce un incremento de la PIO, puede ser una manera rápida de comprobar el efecto de nuevos compuestos para tratar la hipertensión y el glaucoma.

Además de los distintos modelos animales y métodos para estudiar el glaucoma existen varias cepas diferentes de ratón para el estudio de la patología ya que un solo modelo glaucomatoso no puede abarcar ni todos los aspectos que se manifiestan ni todos los tipos de glaucoma que existen en el ser humano (Fernandes et al., 2015). Gracias a esta diversidad de modelos se ha hecho un cambio de corriente en la última década hacia el uso de los modelos de ratón para glaucoma, debido fundamentalmente a la fisiología del segmento anterior del ojo. Además, los ratones y los seres humanos comparten patrones cíclicos de la presión intraocular a lo largo del día (Savinova et al., 2001, Aihara et al., 2003, Mosaed et al., 2005, Lin et al., 2008). También comparten muchas de las mutaciones que desencadenan enfermedades en el segmento anterior, y lo más importante es que tanto los parámetros fisiológicos en el mecanismo de regulación de producción y drenaje de humor acuoso como la respuesta a los fármacos para disminuir la presión intraocular es similar entre ambas especies (Aihara et al., 2003, Weinreb et al., 2002, Lei et al., 2011, Boussommier-Calleja et al., 2012). Aunque los ratones tienen un cristalino más grande que el del ser humano (Schmucker and Schaeffel, 2004) las consecuencias que tiene el tamaño cristalino en la patología del glaucoma no se ha estudiado.

Existen numerosas líneas murinas en las cuales la patología del glaucoma o síntomas y signos asociados al glaucoma aparecen debido a mutaciones genéticas que desencadenan un cambio en la fisiología de la dinámica del humor acuoso o en la biología de las células de la retina. Un modelo de ratón que desarrolla glaucoma y cursa con hipertensión ocular es el DBA/2J (Libby et al., 2005) y el DBA/2NNia (Bayer et al., 2001). También se pueden crear ratones transgénicos, que presentan una PIO elevada mediante una mutación en la subunidad alfa 1 de colágeno tipo 1



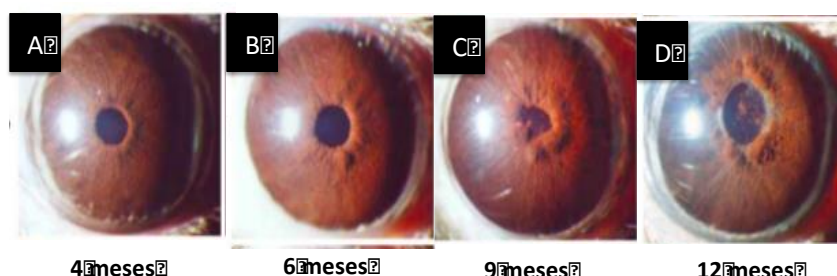
(Mabuchi et al., 2004). Existen otros tipos de modificaciones genéticas en los ratones que desencadenan una pérdida de células de la retina (Smith et al., 2000) o a los que se les induce la patología mediante inyecciones episclerales o tratamientos con láser como se ha mencionado anteriormente.

### 2.6.1 Modelo murino de glaucoma: el DBA/2J

Los ratones de la cepa DBA/2J se han empezado a utilizar recientemente para la investigación del glaucoma. En la mayoría de los casos, este modelo animal se ha empleado para el estudio del estado de la retina de diversas formas, enfocados principalmente a la neuroprotección de la misma (Howell et al., 2007, Froger et al., 2012, Inman et al., 2013). Incluso tratándose de estudios que consistían en la administración de fármacos para reducir la presión intraocular en estos ratones glaucomatosos, la meta de estos fue estudiar el estado de la retina tras su administración (Schuetttauf et al., 2002, Saleh et al., 2007).

El ratón DBA es muy interesante para el estudio de glaucoma ya que desarrolla progresivamente cambios en sus ojos, incluyendo atrofia de iris, dispersión pigmentaria y pérdida de las células ganglionares de la retina (Chang et al., 1999, Anderson et al., 2001, Inman et al., 2006). Esto se traduce en que los ratones DBA desarrollen glaucoma con la edad, causado por la dispersión pigmentaria de iris y atrofia estromal del mismo como resultado de mutaciones producidas en los genes proteína glicosilada *Gpnmb* y proteína 1 relacionada con la tirosinasa *tyrp1*, involucrado en la síntesis de la melanina y la estructura de los melanocitos (los alelos mutados son *Gpnmb*<sup>R150X</sup> y *tyrp1*<sup>b</sup>). Su fenotipo tiene bastantes similitudes con el glaucoma pigmentario en los humanos (John et al., 1998, Libby et al., 2005, Howell et al., 2007), y se considera un glaucoma de tipo pseudoexfoliativo (Anderson et al., 2002). El acumulo de pigmento en la malla trabecular de los ojos de estos ratones DBA pueden ocluir los espacios de la malla y producir que el drenaje del humor acuoso decaiga, dando lugar a una presión intraocular elevada. Los valores de presión intraocular se elevan progresivamente entre los 2 y 6 meses de edad, siendo muy significativo entre los 8 y 12 meses

(Saleh et al., 2007, Harazny et al., 2009) alcanzando el máximo valor de presión intraocular una vez que el animal alcanza los 11 meses de edad (Scholz et al., 2008).



**Figura 6. Evolución del polo anterior del ratón DBA/2J con la edad.**

**Imagen modificada de (Libby et al., 2005).**

Los ratones C56BL/6J son homocigotos para los genes *Gpnmb*<sup>R150X</sup> y *tyrp1*<sup>b</sup> y debería compartir con los DBA/2J la fuerte subida de presión intraocular y el desarrollo del glaucoma. Sin embargo, los ratones C57BL/6J rara vez desarrollan el síndrome de dispersión pigmentaria (Anderson et al., 2006). Esta respuesta diferente al desarrollo del síndrome de dispersión pigmentaria por parte de las dos cepas de ratón puede representar el síndrome de dispersión pigmentaria en humanos, y que sólo una parte de ellos desarrolla hipertensión ocular (Siddiqui et al., 2003).

Estos ratones no sólo presentan cambios a nivel de cámara anterior, sino que se ha descrito que a nivel de retina y de células ganglionares experimentan los procesos asociados al glaucoma, como la disminución de transporte axonal y pérdida de las células ganglionares asociados al incremento de la presión intraocular (Danas et al., 2003, Libby et al., 2005, Crish et al., 2010). También ha sido posible observar en este modelo animal una elevada actividad de la microglía a nivel de las capas más internas de la retina y en la región de la cabeza del nervio óptico, la cual aparece después del primer mes de vida y se va incrementando entre los 5 y los 8 meses de edad llegando a aparecer activadas incluso lejos del

nervio óptico (Bosco et al., 2011). Debido a que la presión intraocular en este modelo animal se eleva por una disfunción en el flujo del humor acuoso, se ha estudiado acerca de la dinámica de este y de los cambios en los procesos ciliares y en el ojo utilizando imágenes de resonancia magnética. Esto ha permitido una nueva vía de observación en los estudios de fármacos aplicados tópicamente para el tratamiento del glaucoma en este modelo animal y así observar su comportamiento en función del estado de la patología (Crosbie et al., 2019). En relación con el tratamiento del glaucoma a nivel de polo posterior, se han llevado a cabo varios estudios en este modelo animal sugiriendo un efecto neuroprotector mediante la regulación de la concentración del  $Ap_4A$  a nivel de retina (Perez de Lara et al., 2018) o tratando los nódulos de Ranvier que aparecen asociados a la patología (Smith et al., 2018).

A pesar de que el tratamiento que más se emplea para el glaucoma es la administración tópica de agentes que reducen la presión intraocular, no existen muchos artículos científicos en modelos animales con la presión elevada de forma natural, como el DBA/2J, donde se vea el efecto de este tipo de tratamiento. A excepción del artículo de 2016 de Sawada et al, donde probaron el efecto a corto plazo de dorzolamida, timolol, una combinación del timolol y la dorzolamida, brimonidina y travoprost (Sawada et al., 2016), obteniendo como resultado que todos los fármacos, salvo el timolol y la combinación de este con la dorzolamida, eran capaces de reducir la PIO en los ratones DBA/2J.

### 3. NUCLEÓTIDOS, DINUCLEÓTIDOS Y RECEPTORES PURINÉRGICOS

#### 3.1 Los nucleótidos

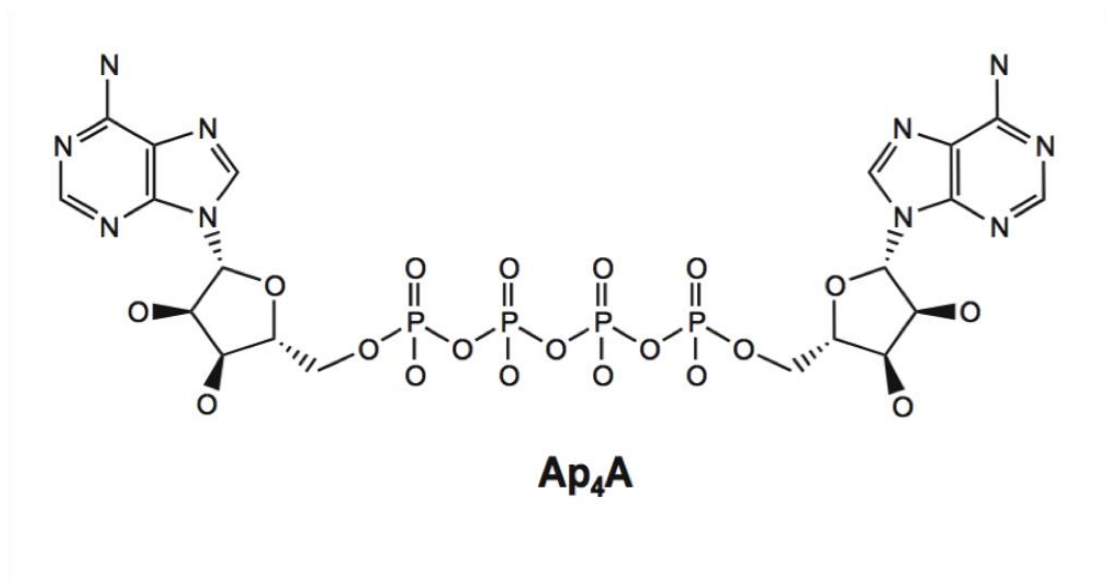
Los nucleótidos son moléculas orgánicas que actúan como mensajeros extracelulares y cuentan con una numerosa implicación en diversos procesos biológicos y bioquímicos a nivel celular, siendo el ATP el nucleótido más importante, universalmente conocido por ser la fuente de energía en los procesos metabólicos pero que también es capaz de participar en funciones vitales, tales como la apoptosis celular (Elliott et al., 2009), el mantenimiento de gradientes iónicos de membrana, en la regulación enzimática, la síntesis de macromoléculas, y actuando como sillar estructural de ácidos nucleicos o en el trabajo mecánico del movimiento celular (Lazarowski et al., 2003). En condiciones fisiológicas normales el ATP se libera en conjunto con diversos neurotransmisores como la acetilcolina, la norepinefrina, el glutamato etc. (Burnstock 1999).

Este nucleótido púrico no es el único que participa en estos procesos, también lo hace el ADP y de la misma forma, los nucleótidos pirimidínicos (UTP y/o UDP) participan en procesos metabólicos. Podemos decir que el ATP, UTP, ADP y UDP tienen un papel importante en diferentes funciones que incluyen la neurotransmisión excitatoria, el procesamiento del desarrollo, funciones pulmonares, del dolor, auditivas y oculares, en la apoptosis, la formación en la metástasis etc. (Williams and Jarvis, 2000).

La mayoría de las acciones de los nucleótidos se llevan a cabo actuando en la membrana de los receptores purinérgicos o P2 (Pintor and Miras-Portugal, 1995b).

- **Dinucleótidos: El  $Ap_4A$  y su papel en el ojo**

Los dinucleótidos diadenosina polifosfatos son compuestos naturales formados por dos moléculas de adenosina unidas en las posiciones 5' por una cadena de grupos fosfatos de longitud variable que puede oscilar entre 2 y 7 fosfatos ( $Ap_nA$   $n=2-7$ ) (Miras-Portugal et al., 1999) y que desempeñan un papel destacado a nivel celular, tanto en el núcleo como en el citosol de la misma (Zamecnik, 1992). La estructura de estas moléculas es importante por la capacidad que tienen para unirse a los receptores purinérgicos.



**Figura 7. Estructura de la molécula de diadenosina tetrafosfato.**

**La longitud de la cadena polifosfatada que une los motivos de adenosina es de 4 fosfatos.**

El  $Ap_4A$  se almacena y se libera junto a los mononucleótidos (AMP, ADP y ATP) al medio extracelular desde los gránulos de las plaquetas, de las cromafinas, y también desde las terminales sinápticas (Rodríguez del Castillo et al., 1988, Pintor et al., 1993, Pintor and Miras-Portugal, 1995a). El sistema vascular es el lugar donde existe el mayor reservorio de los dinucleótidos diadenosina tetrafosfato (Schluter et al., 1994). La concentración del  $Ap_4A$  en las plaquetas y en las células cromafinas es unas 22 veces inferior a la concentración del nucleótido Adenosina trifosfato ATP (Pintor et al., 1992).

Además de contar con la presencia del dinucleótido en la mayoría de los sistemas del cuerpo, se ha demostrado que el dinucleótido  $Ap_4A$  está presente y forma parte de diferentes procesos en todas las estructuras del ojo:

- En superficie ocular está presente tanto en lágrima tanto de conejo como de humano a una concentración del orden de micromolar (Pintor et al., 2002a) y tiene un efecto a nivel de secreción lagrimal, ya que su aplicación tópica es capaz de incrementar la secreción lagrimal en torno a un 60% sobre los valores normales (Pintor et al., 2002b). El  $Ap_4A$  tiene un papel en la cicatrización corneal, acelerando la velocidad del proceso cuando se aplica tópicamente (Pintor et al., 2004a). El aumento de la velocidad de cicatrización también se produce a nivel celular y está relacionado con el receptor  $P2Y_2$  (Mediero et al., 2006). También es capaz de modular los niveles de lactoferrina y lisozima (Peral et al., 2008) y de aumentar la secreción de mucinas en las células *Goblet* (Murakami et al., 2003, Carracedo et al., 2016).

- A nivel de cámara anterior se ha comprobado la presencia de dinucleótidos en el humor acuoso, pudiendo incluso llegar a cuantificar que los niveles de  $Ap_4A$  en el humor acuoso de conejo son de en torno a 0.34 mM (Pintor et al., 2003) y en humano aproximadamente del orden de 0.02 mM (Castany et al., 2011). Se cree que el origen de los dinucleótidos en el humor acuoso es mediado por el epitelio del cuerpo ciliar (Pintor et al., 2003). Todos los tejidos bañados por el humor acuoso tienen receptores purinérgicos, por lo que tanto dinucleótidos como sus metabolitos pueden regular sus funciones fisiológicas incluyendo el transporte de fluido corneal endotelial y la producción y el drenaje del humor acuoso (Crooke et al., 2008). En la actualidad se conoce que la instilación tópica de  $Ap_4A$  en conejo produce un descenso en la PIO (Pintor, 2003). Sin embargo, al estudiar el efecto en los diferentes tejidos de la cámara anterior se observa cómo se produce un efecto contrario entre la malla trabecular y el cuerpo ciliar, facilitando el drenaje en la primera, pero incrementando la producción del humor acuoso desde el segundo.

Se ha demostrado que el  $Ap_4A$  tiene un efecto neuroprotector a nivel de procesos ciliares del ojo, ayudando a prevenir la degeneración a nivel de los nervios intraoculares (Hoyle and Pintor, 2010).

- El cristalino Es el tejido con mayor concentración de nucleótidos en todo el cuerpo y es capaz de secretar dinucleótidos. El epitelio del cristalino puede estar sometido a los nucleótidos que están presentes en el humor acuoso, ya que este fluido baña continuamente la superficie del mismo (Pintor, 2011).

- En la cámara posterior del ojo, el  $Ap_4A$  no tiene un papel tan amplio como lo puede tener en otros tejidos del globo ocular. No obstante, sí que se conoce la función de otros dinucleótidos en cámara posterior, como el INS37217, que se ha usado con buenos resultados para tratar el desprendimiento de retina reabsorbiendo la bulla entre la capa de la retina del epitelio pigmentado y la retina neural (Maminishkis et al., 2002). Algunos dinucleótidos están presentes en la coroides y pueden activar los pericitos del sistema microvascular de la retina induciendo un aumento de los niveles de calcio y produciendo contracción celular (Kawamura et al., 2003, Sugiyama et al., 2006). Recientemente se han descrito cambios de la concentración del  $Ap_4A$  durante la degeneración de la retina causada por el glaucoma. Este aumento de la concentración del dinucleótido a su vez produce cambios en la actividad de las ecto-nucleotidasas y da lugar a una liberación concomitante de ATP, la cual induce diferentes cambios fisiológicos como la apoptosis celular al estimular los receptores P2X7, sugiriendo que si se mantienen en valores normales, podría contribuir a la protección frente al daño retiniano (Perez de Lara et al., 2018).

### 3.2 Receptores purinérgicos

En 1976 fue definido por primera vez el sistema de señalización purinérgica, el cual empleaba nucleótidos y nucleósidos como mensajeros extracelulares (Burnstock, 1976). Fue en 1985 cuando se determinó por primera vez la existencia de los dos subtipos de receptores purinérgicos P2X y P2Y (Burnstock and Kennedy,

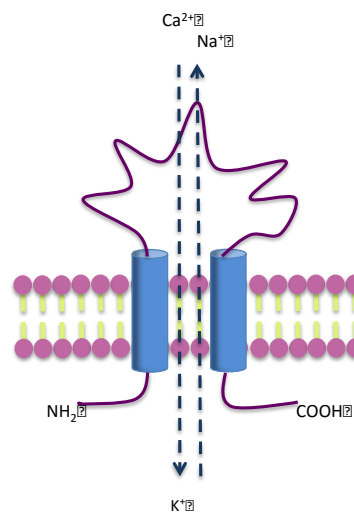
1985). Los receptores purinérgicos son unos excelentes mensajeros extracelulares dirigidos a células de tipo no neuronal, incluyendo células secretoras, exocrinas y endocrinas, células endoteliales, del sistema inmune, músculo-esqueléticas y células inflamatorias (Burnstock and Knight, 2004). Conforman un sistema eficaz y rápido en el proceso la neurotransmisión, neuromodulación y secreción, y a su vez tienen un efecto prolongado en la proliferación, diferenciación, migración y muerte en el desarrollo y regeneración en general (Burnstock, 2016). Los estudios sobre estos receptores y el sistema purinérgico han continuado hasta la actualidad, ya que a lo largo de los años se ha podido descubrir que actúa como un importante mecanismo terapéutico en un gran abanico de enfermedades, debido a su papel regulador en las principales funciones biológicas (Burnstock and Volonte, 2012). Se considera que actuar sobre los receptores P2X y/o P2Y puede servir para tratamiento de la hipertensión y del fallo cardiaco congénito (Balogh et al., 2005, Nishimura et al., 2017). Más específicamente, los receptores P2Y que han sido los receptores de estudio en el presente trabajo son importantes en enfermedades como la diabetes (Solini et al., 2003) artritis, osteoporosis, osteolisis inducida por tumor y periodontitis (Dixon and Sims, 2000), fallo renal o hígado poliquístico (Turner et al., 2004), fibrosis quística (Bennett et al., 1996) y bronquitis crónica (Olivier et al., 1996), entre otras. En el campo de oftalmología se emplean tratamientos relacionados con los receptores P2Y en el desprendimiento de retina o en patologías como el ojo seco (Maminishkis et al., 2002, Nichols et al., 2004), en la ayuda a la cicatrización (Klepeis et al., 2004) y como tratamiento para glaucoma (Pintor, 2003).

Los receptores P2X son más restrictivos, estructuralmente hablando, que los P2Y en cuando a la selectividad de los agonistas. Los primeros responden principalmente al ATP como el ligando activo, mientras que los receptores P2Y pueden ser activados por un grupo de 5 o más nucleótidos incluyendo el ADP y el UDP entre otros (Lazarowski et al., 2003).



- **Receptores ionotrópicos P2X**

Los receptores P2X son canales iónicos integrados en la membrana plasmática y están involucrados en la neurotransmisión excitatoria rápida (del orden de milisegundos). Una vez activados son capaces de mediar el paso no selectivo de cationes como el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Ralevic and Burnstock, 1998, North, 2002). Debido a su rápida capacidad de respuesta estos receptores se encuentran localizados en tejidos con células excitables, como las células musculares lisas, la glía y las neuronas (Edwards et al., 1992, Sneddon et al., 2000). Se han clonado siete receptores P2X (P2X1-7) y todos ellos comparten la misma topología en las subunidades. Cada monómero está formado por dos dominios transmembrana que regulan la apertura de los canales, un bucle extracelular con diez residuos de cisteína, y un terminal  $\text{NH}_2$  (N-terminal) y  $\text{COOH}$  (C-terminal) intracelular, siendo el extremo C-terminal el que confiere las propiedades específicas de cada subunidad P2X (Vial et al., 2004, Silberberg et al., 2005). Las subunidades se ensamblan en trímeros formando homo o hetero-oligómeros y así conforman canales funcionales nativos, ya que por sí solas carecen de funcionalidad (Nicke et al., 1998).



**Figura 8. Esquema representativo de los receptores P2X**

Los receptores P2X se pueden dividir en dos grupos fundamentales, en función de su afinidad con sus antagonistas. Al grupo 1 pertenecen los subtipos P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub> y se caracterizan por tener una gran afinidad con el ATP y por activarse y desensibilizarse rápidamente, siendo el análogo de ATP 3'-O-(4-benzoil) o benzoil ATP (BzATP) el agonista más potente para estos receptores. Otros agonistas, aunque menos efectivos, son el 2-metiltio ATP (2-MeSATP) y el  $\alpha,\beta$ -metilen ATP ( $\alpha,\beta$ -meATP) y  $\beta,\gamma$ -metilen ATP ( $\beta,\gamma$ -meATP) que se utiliza sólo como agonista selectivo de P2X<sub>1</sub>. Como principales antagonistas, se encuentran los diinosina polifosfatos para el receptor P2X<sub>1</sub> y la suramina para el P2X<sub>3</sub>. En el grupo 2 estarían incluidos los subtipos P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub> y P2X<sub>7</sub> que tienen una baja afinidad por el ATP, así como una desensibilización lenta y una despolarización sostenida. Aunque el agonista principal sea el ATP, también actúan como agonistas para el subtipo P2X<sub>2</sub> el 2-meATP y el ATP $\gamma$ S. En el caso del P2X<sub>4</sub> y del P2X<sub>5</sub> también se pueden activar por 2-MeSATP, y para el P2X<sub>7</sub> es el BzATP. Los antagonistas de este segundo grupo son el PPADS, el 2,4,6-trinitrofenol adenosina 5'-trifosfato (TNP-ATP) y el reactivo azul-2 (RB-2) para P2X<sub>2</sub>, el PPADS o la suramina para P2X<sub>5</sub> y el azul brillante G (*brilliant blue* G: BBG) para el P2X<sub>7</sub>. Los diadenosina polifosfatos pueden ser también agonistas de los receptores P2X. El Ap<sub>6</sub>A es un agonista de P2X<sub>1</sub> mientras que el Ap<sub>5</sub>A y el Ap<sub>4</sub>A son agonistas parciales del mismo (North, 2002, Gevert et al., 2006, Coddou et al., 2011).

Los receptores P2X se expresan en todo el organismo y son capaces de mediar en procesos diversos como la transmisión sináptica o la coagulación sanguínea (Robertson and Edwards, 1998, Sneddon et al., 2000).

Son varias las estructuras oculares en las que estos receptores tienen un papel importante. En concreto, el receptor P2X<sub>7</sub> ha sido ampliamente estudiado y está presente en la glándula lagrimal, siendo activado por el ATP, el cual actúa como un agonista que provoca el incremento de la secreción lagrimal (Hodges et al., 2009). También está presente en la córnea y es capaz de modular su integridad (Mayo et al., 2008). Además, se ha podido demostrar el efecto de los dinucleótidos

sobre estos receptores, comprobando el efecto hipotensor del receptor P2X<sub>1</sub> cuando se activa con Ap<sub>4</sub>A (Guzman-Aranguez et al., 2007). A nivel de polo posterior cabe destacar que los receptores P2X son capaces de modular la señalización visual (Chavda et al., 2016).

**Tabla 1. Clasificación de los receptores P2X.**

Los datos reflejados en la tabla están modificados de (Guzman-Aranguez et al., 2007, Jacobson, 2010, Burnstock, 2014).

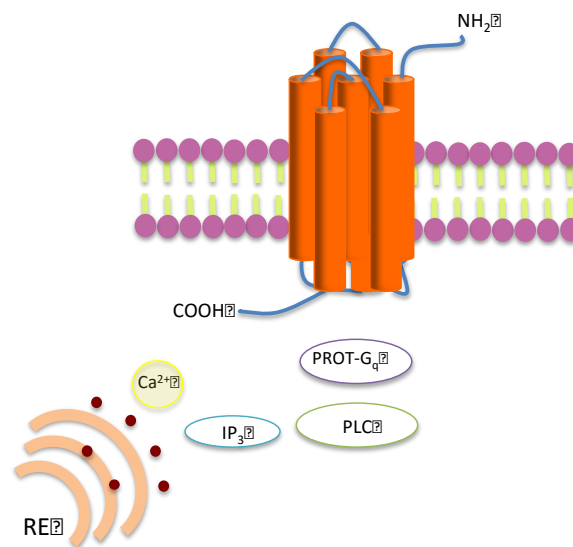
Receptor	Agonistas principales	Antagonistas	Distribución mayoritaria
P2X <sub>1</sub>	BzATP> Lβ,γ-meATP≥ ATP= 2-MeSATP= α,β-meATP; PAPET-ATP Ap <sub>6</sub> A> Ap <sub>5</sub> A> Ap <sub>4</sub> A> Ap <sub>3</sub> A	NF449> IP <sub>5</sub> I> TNP-ATP> RO0437626> NF110> NF279, NF023, RO1; MRS2159> PPNDS; Suramina= PPADS;	Cerebro, médula espinal, músculo liso, plaquetas, ganglios simpáticos
P2X <sub>2</sub>	ATP≥ATPγS≥2-MeSATP>> α,β-meATP>β,γ-CF <sub>2</sub> meATP;BzATP Ap <sub>4</sub> A	PSB-1011> RB2= NF279, isoPPADS> PPAD> Suramina, NF770, NF778, aminoglicosido; TNP-ATP	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, neuronas sensoriales
P2X <sub>3</sub>	2-MeSATP≥ ATP≥ α,β-meATP; PAPET-ATP; BzATP Ap <sub>3</sub> A> Ap <sub>4</sub> A> Ap <sub>5</sub> A> Ap <sub>6</sub> A	TNP-ATP,iso-PPADS> A317491> NF110> PPADS, IP <sub>5</sub> I, rojo fenol, RO4, RN1838, espinorfina, AF353; RO85	Cerebro, pituitaria, médula espinal, ganglios simpáticos, neuronas sensoriales
P2X <sub>4</sub>	ATP> α,β-meATP,CTP,2-MeSATP; BzATP Potenciación por ivermectina y azul de cibacron y RB-2 Ap <sub>6</sub> A>Ap <sub>4</sub> A	5-BDBD>>TNP-ATP, PPADS>BBG, paroxetina, fenofaleína, CORM2, fluoxetina	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, testículos, colon.
P2X <sub>5</sub>	ATP= 2-MeSATP=ATPγS>>> α,β-meATP; GTP Ap <sub>4</sub> A> Ap <sub>5</sub> A> Ap <sub>6</sub> A> Ap <sub>3</sub> A	BBG> PPADS> Suramina> RB-2; TNP-ATP	Médula espinal, ganglio del trigémino, células proliferativas de la piel, timo, vejiga
P2X <sub>6</sub>	Sólo como heteromultímero	Sólo como heteromultímero	Ganglios simpáticos, cerebro, médula espinal
P2X <sub>7</sub>	BzATP>> ATP≥2-MeSATP>> α,β-meATP= β,γ-meATP Ap <sub>2</sub> A; Ap <sub>3</sub> A; Ap <sub>4</sub> A; Ap <sub>5</sub> A; Ap <sub>6</sub> A; (1mM)	A-740003> A-438079; BBG; A804598; AZ11645373: A-847227: AZ-10606120; CBB; GSK314181a: GSK1482160; suramina, PPAD, KN-62(no competitivos); KN-04; MRS2427; RN-6189; GSK1370319; AZ-109056; AZD_9056; CE-222,535; oxATP	Ganglios de reina y cóclea, células inmunes, cerebro, médula espinal, páncreas y piel

## Receptores metabotrópicos P2Y

Los receptores P2Y son miembros de la familia de los receptores acoplados a la proteína G (Burnstock and Kennedy, 1985). Contienen las características típicas de estos receptores, como siete dominios transmembrana hidrofóbicos conectados entre sí por tres lazos extracelulares y tres lazos intracelulares. El extremo N-terminal extracelular presenta sitios para la glicosilación y el dominio intracelular C-terminal contiene sitios potenciales para la fosforilación. Pueden acoplarse a proteínas transmembrana como PLC y la adenilato ciclasa o a canales iónicos mediante la interacción con las subunidades específicas de las proteínas G, pudiendo activar diferentes mecanismos de señalización intracelular (Ralevic and Burnstock, 1998, Abbracchio et al., 2003). Ambos forman parte del proceso de desensibilización en internalización del receptor (Jacobson et al., 2012).

En humano o en mamífero se han clonado y caracterizado ocho subtipos de los receptores P2Y: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> (Abbracchio et al., 2006). Desde un punto de vista de la transducción de la señal la activación de muchos receptores purinérgicos está relacionada con las proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAP quinasas, en concreto con la proteína quinasa regulada por señal extracelular o ERK ½ (Neary et al., 1998). Los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub> se acoplan a las proteínas G<sub>q</sub> para la estimulación de la fosfolipasa C seguido de la producción de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los reservorios intracelulares (Burnstock, 2007, Jacobson et al., 2012). Estos receptores también activan la proteína quinasa C (PKC) en aquellas células que la expresan, activando a su vez diversas cascadas de señalización secundarias (Erb et al., 2006).

Además, se sabe que el receptor P2Y<sub>11</sub> estimula la actividad de la adenilato ciclasa a través de las proteínas G<sub>s</sub> (Communi et al., 1997) y que es el único que es capaz de acoplarse a proteínas G<sub>q</sub> y G<sub>s</sub> (Sunahara et al., 1996). También se tiene constancia de que P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> se acoplan a la inhibición de la adenilato ciclasa vía G<sub>i/o</sub>, con el consecuente descenso de los niveles de AMPc intracelular (Hollopeter et al., 2001, Jacobson et al., 2012).



**Figura 9. Esquema representativo de la activación de un receptor P2Y**

**Dicho receptor se encuentra ligado a la proteína Gq cuya activación provoca la consiguiente liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplasmático hasta el espacio intracelular.**

Existe una caracterización de los receptores P2Y en función de sus respuestas a los nucleótidos, que actúan como agonistas y los antagonistas selectivos de cada uno de los subtipos de los P2Y. Según esto, los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub> se activan selectivamente mediante nucleótidos de adenina, concretamente el agonista natural más potente para el receptor P2Y<sub>1</sub> es el ADP, y el compuesto sintético 2-MeSADP (2-metiltioADP) también actúa como agonista de este receptor con una afinidad 10 veces superior que el agonista natural (Waldo and Harden, 2004). P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub> se activan por ADP y por derivados sintéticos de ADP (Takasaki et al., 2001) y el receptor P2Y<sub>11</sub> se activa mediante ATP (Communi et al., 1999). Por su parte P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> se activan tanto por nucleótidos de adenina como por nucleótidos de uracilo: el receptor P2Y<sub>2</sub> se estimula equipotencialmente

por ATP y UTP (Lazarowski et al., 1995) mientras que para el receptor P2Y<sub>4</sub> es 50 veces más potente el UTP que el ATP (Communi et al., 1996). El receptor P2Y<sub>6</sub> se activa por nucleótidos de uracilo, es un receptor selectivo para UDP, siendo el agonista que ejerce mayor efecto sobre este receptor (Nicholas et al., 1996, Pendergast et al., 2001) Por último, el receptor P2Y<sub>14</sub> es activado mediante derivados de los azúcares de UDP (von Kugelgen, 2006).

Respecto a cómo se antagonizan estos receptores, la mayoría de los antagonistas que existen afectan a más de un receptor: El PPADS y el reactivo azul 2 (RB2), inhibe varios subtipos de P2Y teniendo mayor efectividad con los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>6</sub>. La suramina actúa sobre todos los receptores P2Y sensibles a nucleótidos excepto el P2Y<sub>4</sub>. Existen pocos antagonistas específicos, que ayudan a poder identificar a ciertos receptores de manera específica. Uno de estos antagonistas específicos es el compuesto MRS2179 que actúa sobre el receptor P2Y<sub>1</sub>. Por su parte, el análogo de DIDS 1,2-di-(4-isotiocianofenil)etano, el MRS2567 es capaz de inhibir el receptor P2Y<sub>6</sub> sin producir ningún efecto en P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>11</sub> (Mamedova et al., 2004).

Los receptores P2Y se expresan a lo largo de todo el organismo, pudiendo regular por si mismos o modular diferentes funciones fisiológicas (Fischer and Krugel, 2007) como la regulación de los procesos de neurodegeneración y neuroprotección dentro del sistema nervioso central (Ortega et al., 2011). Aunque se sabe poco sobre las funciones de los receptores purinérgicos, algunos estudios han mostrado un papel fundamental del P2Y<sub>6</sub> en relación a la fagocitosis (Koizumi et al., 2007) y del P2Y<sub>12</sub> en procesos de extensión (Haynes et al., 2006). También ha sido descrita una sobrerregulación de los receptores P2Y<sub>1</sub> P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>12</sub> en la microglía en los primeros días de vida (Crain et al., 2009).

Tabla 2. Clasificación de los receptores P2Y.

Los datos reflejados en la tabla están modificados de (Guzman-Aranguez et al., 2007, Burnstock, 2014).

Receptor	Agonistas principales	Antagonistas	Transducción de la señal	Distribución mayoritaria
P2Y <sub>1</sub>	MS2365> 2MeSADP= Ap <sub>5</sub> (βγ)>> ADPβS> ATP> 2MeSATP= ADP Ap <sub>3</sub> A> Ap <sub>4</sub> A> Ap <sub>5</sub> A= Ap <sub>6</sub> A>> Ap <sub>2</sub> A	MRS2500> MRS2279> MRS2179>> Suramina> PPADS; PIT	G <sub>q</sub> / G <sub>11</sub> PLCβ/ IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Plaquetas, cerebro, placenta, próstata, endotelio, corazón, tracto digestivo, células gliales
P2Y <sub>2</sub>	2-S-UTP> UTP, MRS2698> ATP, INS365> INS37217, UTPγS> ATPγS, MRS2768, Up4-fenil éster, Ap <sub>4</sub> A> Ap <sub>5</sub> A> Ap <sub>6</sub> A> Ap <sub>3</sub> A	AR-C126313> Suramina> RB-2, PSB716, MRS2576	G <sub>q</sub> / G <sub>11</sub> , G <sub>0</sub> , G <sub>12</sub> PLCβ/ IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> Activación AC	Músculo esquelético, músculo liso, pulmón, hueso, macrófagos, bazo, linfocitos, osteoblastos, riñón
P2Y <sub>4</sub>	2-N3-dUTP> UTPγS, UTP≥ ATP≥ Ap <sub>4</sub> A, INS365; INS31217; CTP; ITP	(ATP en humano)> RB-2> Suramina, MRS2577, PPADS	G <sub>q</sub> / G <sub>11</sub> , G <sub>i/o</sub> PLCβ/ IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Intestino, cerebro, pituitaria, médula ósea, linfocitos, monocitos, hígado
P2Y <sub>6</sub>	MRS2693> UDPβS, PSB0474> INS48823, Up <sub>3</sub> U, fenacil-UDP>>> UDP> UTP>> ATP, α,β-meUDP; IDP, Ap <sub>5</sub> A> Ap <sub>3</sub> A (>1mM)	MRS2578> RB-2, PPADS, MRS2567, MRS2575 (humano); suramina	G <sub>q</sub> / G <sub>11</sub> PLCβ/ IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Placenta, bazo, riñón, corazón, músculo liso, células adiposas, intestino, cerebro, timo, pulmón
P2Y <sub>11</sub>	ATPγS AR-C67085MX> BzATP≥ ATP, NF546, NAD <sup>+</sup> , NAADP <sup>+</sup> , 2MeSATP	NF157> suramina> Rb-2, 5'-AMPs, NF340, AMP-α <sub>5</sub>	G <sub>q</sub> / G <sub>11</sub> , G <sub>5</sub> PLCβ/ IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> Activación AC	Cerebro, hígado, bazo, pituitaria, intestino, linfocitos B, células dendríticas, granulocitos
P2Y <sub>12</sub>	2MeSADP= 2MeSATP>> ADP>> ATP, ADPβS	AR-C69931MX> AZD6140, INS50589> RB-2> 2MeSAMP, ARC66096, CT50547, PSB0413, carba-nucleóxidos, MRS2395, AR-C67085; Clopidogel; Tioclopidina; Suramina; INS49266	G <sub>i</sub> Inhibición AC	Plaquetas humanas, cerebro, megacariocitos
P2Y <sub>13</sub>	ADP= 2MeSADP> 2MeSATP, ATP, Ap <sub>4</sub> A	AR-C69931MX> AR-C67085> MRS2211, 2MeSAMP; PPADS> Suramina	G <sub>i/o</sub> PLCβ/ IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> Inhibición AC	Bazo, cerebro, células gliales, páncreas, médula ósea, ganglios linfáticos, hígado, corazón, hueso
P2Y <sub>14</sub>	MSR2690> UDP> UDP-glucosa> UDP-galactosa> UDP glucónico> UDP-N-acetilglucosamina	No conocidos	G <sub>i/o</sub> Activación PLC	Placenta, tejido adiposo, estomago, intestino, cerebro, bazo, corazón, pulmón

- **Receptor P2Y<sub>1</sub>**

El receptor P2Y<sub>1</sub> está involucrado en el cambio inicial y la agregación plaquetaria (Leon et al., 1999). Este receptor está presente en muchas estructuras del ojo, como el iris y el epitelio pigmentado y el no pigmentado de los procesos ciliares de diferentes especies (Farahbakhsh and Cilluffo, 2002, Pintor et al., 2004c). Está implicado en la reducción de la producción de humor acuoso, y por tanto en la disminución de la PIO (Crosson et al., 2004). Además, se ha podido comprobar que puede ser activado mediante el Ap<sub>4</sub>A facilitando el drenaje del humor acuoso en la malla trabecular de células bovinas (Soto et al., 2005).

Debido a sus propiedades el P2Y<sub>1</sub> es susceptible de ser utilizado como objetivo para la terapia antiglaucomatosa, mejorando el flujo del humor acuoso a través de la malla trabecular (Soto et al 2005). Se ha demostrado la implicación de este receptor presente en la malla trabecular, en combinación con el P2Y<sub>6</sub>, en la reducción de la PIO, activándolos con el dinucleótido sintético diinosina tetrafosfato (IP<sub>4</sub>I) (Guzman-Aranguez et al., 2012).

- **Receptor P2Y<sub>2</sub>**

El receptor P2Y<sub>2</sub> es capaz de activar varias vías de señalización, como hemos mencionado con anterioridad, incluidas las de PKC, PLA<sub>2</sub>, canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> y formación de óxido nítrico preferencialmente (Ralevic and Burnstock, 1998) , aunque también en casos excepcionales, la vía de la adenilato ciclasa.

Este receptor se encuentra distribuido en diversos tejidos y estructuras como los astrocitos, las células sanguíneas, endoteliales, epiteliales, hepatocitos, fibroblastos, queratinocitos, osteoblastos y células tumorales entre otras (Ralevic and Burnstock, 1998). También está presente en las células del corazón, cardiomiocitos (Wihlborg et al., 2006), y juega un papel importante en la protección de la isquemia de los mismos (Yitzhaki et al., 2006). Está considerado como el receptor con mayor funcionalidad dentro del ojo (Pintor et al., 2004c). Se



encuentra presente en iris y en los procesos ciliares de diferentes especies, tanto en epitelio pigmentado como el no pigmentado (Shahidullah and Wilson, 1997, Farahbakhsh and Cilluffo, 2002, Pintor et al., 2004c), en la malla trabecular (Crosson et al., 2004, Chow et al., 2007), y en el epitelio pigmentado de la retina (Sullivan et al., 1997); está involucrado en la dinámica del humor acuoso (Fleischhauer et al., 2001, Soto et al., 2004) y su activación en la retina promueve la absorción de fluidos y podría estar relacionado con el desprendimiento de retina (Maminishkis et al., 2002).

La activación del receptor  $P2Y_2$  produce un incremento de la PIO, y se ha comprobado que el uso de siRNA contra el  $P2Y_2$  reduce la PIO en un  $48 \pm 5\%$ . Este hecho lo ha situado como candidato para tratar la PIO anormalmente elevada que sufren los pacientes con glaucoma (Martin-Gil et al., 2012). Además se ha demostrado que los pacientes con glaucoma tienen valores elevados  $Ap_4A$  comparado con pacientes sanos (Zhang et al., 2007). Este receptor puede ser activado por el  $Ap_4A$ , pudiendo así correlacionar el alto nivel de este dinucleótido en el humor acuoso de pacientes con glaucoma y el aumento de PIO en la patología.

- **Receptor  $P2Y_6$**

Este receptor se encuentra presente en células: endoteliales, musculo liso y macrófagos. El  $P2Y_6$  receptor resulta de gran interés, debido a que estas células tienen una gran implicación durante la formación de las lesiones arterioescleróticas (Bar et al., 2008). Al igual que el  $P2Y_2$ , el  $P2Y_6$  se encuentra en los cardiomiocitos, células del corazón (Wihlborg et al., 2006). Sin embargo, el papel del  $P2Y_6$  en esta estructura está relacionado con la fibrosis cardiaca derivada de una elevada presión (Nishida et al., 2008). En la microglía, el UDP puede estimular la absorción de microesferas mediada por el receptor  $P2Y_6$  (Koizumi et al., 2007).

En el ojo está descrito que el receptor  $P2Y_6$  aparece localizado en los procesos ciliares de rata, concretamente se encuentra en el área estromal, no en el propio epitelio (Pintor et al., 2004c). La razón por la que está localizado en el

estroma puede ser debido a que, como se ha descrito con anterioridad, este receptor se encuentra presente en los vasos sanguíneos y puede modificar el flujo de sangre (Malmsjö et al., 2003). Así, cuando es estimulado por un agonista, al estar presente en el estroma de los vasos sanguíneos de los procesos ciliares, se induce una vasoconstricción que implica una reducción en la producción del humor acuoso y finalmente en una reducción de la PIO (Markovskaya et al., 2008). Tal como sucede con el  $P2Y_1$ , se ha comprobado el efecto hipotensor de este receptor mediante los ensayos con  $Ip_4I$  y sus antagonistas (Guzman-Aranguez et al., 2012).

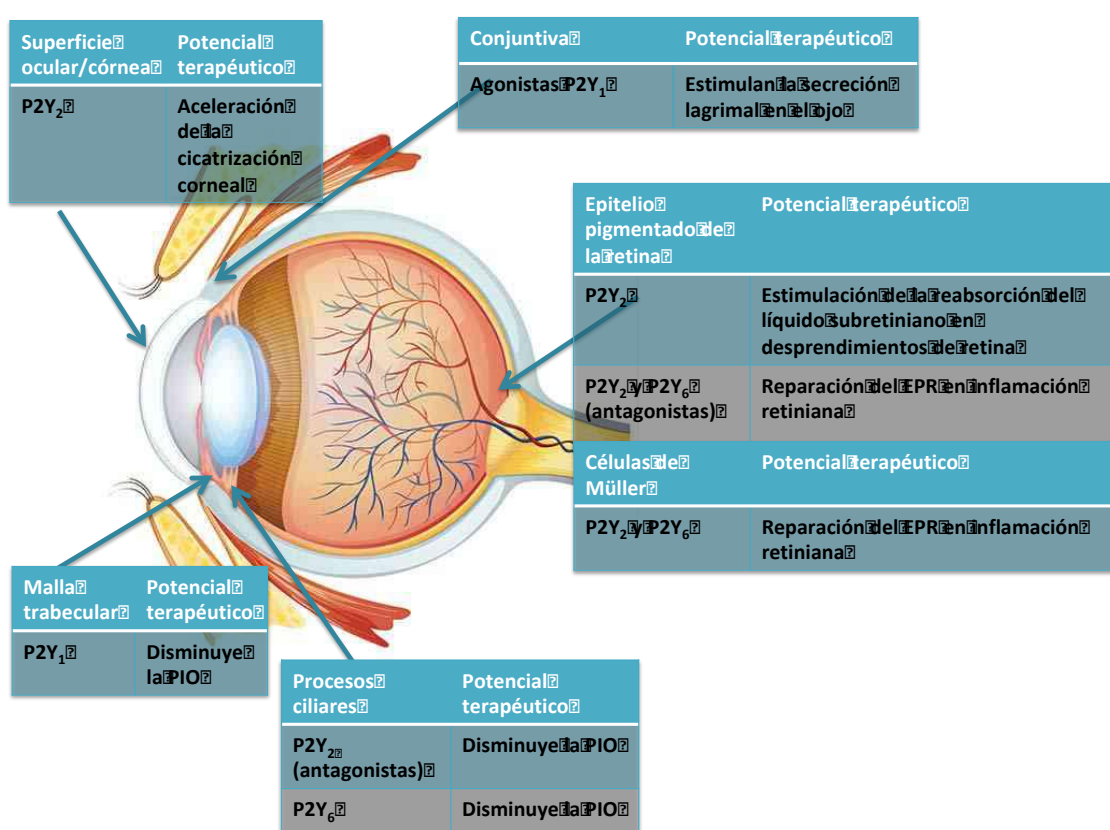


Figura 10. Acciones del dinucleótido  $Ap_4A$  sobre los receptores purinérgicos.

Representación de  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  y  $P2Y_6$  en las diferentes estructuras oculares. Imagen modificada: [https://www.partesdel.com/internas\\_ojo.html](https://www.partesdel.com/internas_ojo.html):

**Tabla 3. Representación de los receptores purinérgicos P2Y de estudio en la presente tesis expresados en el globo ocular. Tabla modificada de (Guzman-Aranguez et al., 2013)**

Receptor	Localización	Especie	Funciones
<b>P2Y<sub>1</sub></b>	Endotelio corneal	Conejo rata y humano	Sin determinar
	Glándula lagrimal	Rata	Inducción de la concentración de calcio intracelular
	Procesos ciliares	Conejo	Sin determinar
	Malla trabecular	Bovino, humano, cerdo y rata	Disminución de la pio y regulación del volumen celular
	Fotorreceptores	Conejo rata y macaco Verificar	Sin Determinar
	Células bipolares	Rata	Sin determinar
	Células ganglionares	Conejo, rata y macaco	Sin determinar
	Astroцитos y Células de Müller	Ratón y rata Rata	Homeostasis Extracelular Obtención De Respuestas De Ca <sup>2+</sup>
	Epitelio Pigmentario de la Retina	Humano	Sin Determinar
<b>P2Y<sub>2</sub></b>	Endotelio corneal	Macaco, conejo, rata y humano	Modulación de la re-epitelización corneal
	Epitelio conjuntival	Conejo, macaco y humano	Estimulación de la secreción lagrimal
	Glándula lagrimal	Rata	Inducción de la concentración de calcio intracelular
	Procesos ciliares	Conejo, bovino, primates, rata y humano	Aumento de la PIO
	Malla trabecular	Bovino y cerdo	Sin determinar
	Fotorreceptores	Conejo, rata y macaco,	Sin Determinar
	Células bipolares	Rata	Sin determinar
	Ganglionares	Conejo, rata y macaco	Sin determinar
	Astroцитos y Células de Müller	Rata y humano Cobaya	Obtención de respuestas De Ca <sup>2+</sup> Incrementa la síntesis del ADN
	Epitelio pigmentario de la retina	Conejo, bovino, rata y humano	Incremento en el flujo del fluido desde la membrana apical hasta la basolateral y aumento de la secreción de IL-8
<b>P2Y<sub>6</sub></b>	Endotelio corneal	Conejo rata y humano	Modulación de la re-epitelización corneal
	Procesos ciliares	Conejo y rata	Sin determinar
	Fotorreceptores	Conejo rata y macaco	Sin determinar
	Células bipolares	Rata	Sin determinar
	Células ganglionares	Conejo, rata y macaco	Sin determinar
	Astroцитos y células de Müller	Rata y humano	Obtención de respuestas de ca <sup>2+</sup>
	Epitelio pigmentario de la retina	Humano	Aumento de la secreción IL-8

# Hipótesis y objetivos



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 1. JUSTIFICACIÓN

El glaucoma es una de las causas más comunes de ceguera en los países industrializados (Pascolini and Mariotti, 2012, Bourne et al., 2016). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (Thomson et al.), entre 4,5 y 5 millones de personas son ciegas en todo el mundo por el glaucoma. La prevalencia de la patología aumenta con la edad, afectando aproximadamente por igual a hombres y mujeres y siendo actualmente la raza asiática la más afectada, representando el 47% de la población total con glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) y el 87% de los glaucomas de ángulo cerrado (Quigley and Broman, 2006, Wong et al., 2006, Kapetanakis et al., 2016). El glaucoma primario de ángulo abierto es el más común de todos los subtipos que existen de esta patología ocular, representando el 74% de todos los casos de glaucoma. Además, se ha estimado que el GPAA llegó a afectar a 44 millones de personas en 2013 (Tham et al., 2014).

Asimismo, hay que tener en cuenta que la pirámide poblacional española se muestra invertida para los próximos años, lo cual implica que los pacientes con glaucoma se incrementarán, ya que se sabe que la predisposición a padecer glaucoma se incrementa con el envejecimiento general de la sociedad (Quigley and Vitale, 1997).

Diferentes estudios han demostrado que teniendo controlada la presión intraocular del individuo, la progresión de la patología se ralentiza, estimando que un mmHg reduce la progresión de la enfermedad en un 10%, incluso en pacientes con glaucomas normotensos, es decir, con la PIO dentro de los valores normales o por debajo de lo normal, pero que pierden visión debido al glaucoma, se les recomienda terapias de control de PIO (Webers et al., 2008, Grieshaber and Flammer, 2010, Lee and Goldberg, 2011, Carta et al., 2012). Es por esto que la mayoría de los pacientes diagnosticados de glaucoma utilizan como tratamiento

principal los colirios o soluciones oftálmicas disponibles en el mercado, aunque el tratamiento la mayoría de las veces se ve limitado por los efectos adversos que pueden llegar a causar estos fármacos (Kass et al., 2002).

La etiología del glaucoma sigue siendo “desconocida” en la mayor parte de sus aspectos; seguir investigando nuevas formulaciones y compuestos que no estén relacionados con los que existen actualmente en el mercado, concedería una nueva posibilidad para todos aquellos pacientes que sufren estos efectos adversos y mejoraría la calidad de los tratamientos en futuros pacientes glaucomatosos. Entre los nuevos candidatos para el tratamiento del glaucoma, nos encontramos con los dinucleótidos, cuyos efectos sobre la PIO son prometedores (Pintor, 2003). Por lo que conocer el efecto del  $Ap_4A$ , la localización e implicación de los receptores purinérgicos en un modelo animal que desarrolla hipertensión y glaucoma de manera natural nos proporciona un acercamiento a la ampliación del conocimiento acerca de la patología.

## 2. HIPÓTESIS

Como se ha mencionado en la introducción, los receptores purinérgicos y los dinucleótidos están altamente relacionados con la patología del glaucoma. De acuerdo con trabajos anteriores del grupo y de colaboraciones externas se ha demostrado que los pacientes con glaucoma presentan niveles elevados de dinucleótidos en el humor acuoso con respecto a pacientes sanos (Pintor et al., 2003, Castany et al., 2011). Varios estudios demuestran la actuación del  $Ap_4A$  sobre la presión intraocular y la modulación de los receptores purinérgicos situados tanto en el polo anterior como en el polo posterior del ojo (Pintor et al., 2004b). Además se ha descrito su efecto neuroprotector en los procesos ciliares (Hoyle and Pintor, 2010).

Por otro lado, ha sido posible identificar la distribución de los receptores purinérgicos en las diferentes estructuras oculares de varios modelos animales, lo que proporciona una base molecular que relaciona los efectos de los dinucleótidos

con la patología, en modelos animales normotensos (Pintor et al., 2004b). Se ha caracterizado la presencia de los receptores purinérgicos P2Y en el polo anterior del ojo, habiendo sido descritos en la malla trabecular (Soto et al., 2005) y en los procesos ciliares (Farrabaskhs 2002; Shahidulla 1997); también se ha localizado el receptor P2X2 en el musculo ciliar (Peral et al., 2009). En cuanto a la disposición a nivel de polo posterior de los receptores purinérgicos, existe una variada distribución a lo largo de las diferentes capas de la retina y el sistema nervioso central (Cowlen et al., 2003, Fries et al., 2004, Li et al., 2001). Se ha demostrado la relación de los receptores purinérgicos en la microglía con diferentes enfermedades neurodegenerativas, incluido el glaucoma (Yang et al., 2017, Rodrigues-Neves et al., 2018).

La cepa de ratón DBA/2J es un modelo de gran valor en el estudio del glaucoma, ya que sus características permiten realizar una investigación sobre posibles nuevas modalidades de terapias para el glaucoma. Concretamente en este modelo animal se produce una despigmentación del iris, lo que conlleva a un acumulo de pigmento que produce una obstrucción de la malla trabecular y por tanto un mal drenaje del humor acuoso (asociado a una subida de PIO). Los receptores purinérgicos implicados en la regulación del flujo del humor acuoso presentes en otros modelos podrían estar altamente implicados con el desarrollo del glaucoma en este modelo animal.

***La hipótesis que formulamos en el presente trabajo es que la administración tópica de  $Ap_4A$  en un animal que desarrolla glaucoma de forma natural podría ser beneficioso para el control de la presión intraocular, que se ve elevada con el progreso de la patología. Teniendo en cuenta que el polo posterior sufre un deterioro importante en esta patología, quisimos saber si el  $Ap_4A$  podría además actuar como agente neuroprotector a nivel de la retina en el glaucoma.***



### 3. OBJETIVOS

Basándonos en el importante papel que desempeña el dinucleótido  $Ap_4A$  y los receptores purinérgicos en relación con la patología del glaucoma, los objetivos que quisimos alcanzar fueron:

1. Describir la progresión de la presión intraocular de los animales patológicos o glaucomatosos.
2. Describir y demostrar la presencia de receptores purinérgicos en los procesos ciliares de un animal glaucomatoso.
3. Describir la variación de estos receptores purinérgicos con la evolución de la patología, realizando una caracterización farmacológica completa.
4. Comprobar la eficacia del  $Ap_4A$  como agente hipotensor en un modelo animal glaucomatoso.
5. Comprobar el efecto del  $Ap_4A$  en células microgliales y del epitelio pigmentario de la retina.

# Materiales y métodos



# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. MATERIALES

En este apartado se describen en las siguientes tablas los reactivos, materiales e instrumentos, medios y tampones, material biológico y los programas y herramientas informáticas que se han empleado para el desarrollo de la tesis.

### 1.1 Reactivos

Todos los reactivos, materiales e instrumentos, así como las distintas herramientas informáticas utilizadas en el desarrollo experimental de esta tesis doctoral se resumen en las tablas que se muestran a continuación:

**Tabla 4. Reactivos Generales**

REACTIVO	PROVEEDOR	USO
SpeedTools Total RNA Extraction Kit	Qiagen/Biotools	Biología Molecular
Turbo DNA-free	Ambion	
M-MLV RT reagents, dNTP's	Invitrogen	
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems	
TaqMan® Gene Expression Assays		
β-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	
LuminoCt® Qpcr Ready Mix		
RNase-Zap		
Syber safe DNA gel stain	Thermo Scientific	
DNA loading		
Gene ruler 100pb		
Gene ruler 1kb		
NDS	Jackson Immunoresearch	
Triton X-100	Sigma-Aldrich	
Yoduro de propidio		
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	
Sacarosa	Merk	
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura	
Vectashield	Vector Laboratories, Palex Medical	

Isoflurano (IsoFlo®)	Esteve	Anestesia
DMEM alto contenido en glucosa	Gibco	Cultivos Celulares
DMEM F12		
Penicilina/estreptomicina	Life Technologies	
L-Glutamina		
FBS		
5% Tripsina-EDTA		
DPBS	Invitrogen	
HBSS	Life Technologies	Experimentos de calcio
Sulfapiridina	Sigma-Aldrich	
Fura-2 AM	Thermo Fisher	
Otros reactivos para análisis (NaCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , HCl, CaCl <sub>2</sub> ...)	Merk	Varios

Tabla 5. Agonistas, antagonistas e inhibidores

AGONISTAS, ANTAGONISTAS E INHIBIDORES	PROVEEDOR	USO
Ap <sub>4</sub> A	Sigma-Aldrich	Agonistas P2Y
ATP		
ADP		
UTP		
UDP		
PPADS	TOCRIS	Antagonistas P2Y
RB-2	Sigma-Aldrich	
Suramina	TOCRIS	
MRS2179	Sigma-Aldrich	<i>Antagonista selectivo del P2Y<sub>1</sub></i>
AR-C	TOCRIS	<i>Antagonista selectivo del P2Y<sub>2</sub></i>
MRS2578	Sigma-Aldrich	<i>Antagonista selectivo del P2Y<sub>6</sub></i>

## 1.2 Equipos, instrumentos y materiales

Todos los equipos, instrumentos y material utilizados para desarrollar el trabajo de investigación, especificados dentro de la metodología, aparecen sintetizados en la siguiente tabla:

Tabla 6. Equipos, instrumentos y materiales

EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES	PROVEEDOR	USO
StepOne Plus Real Time System	Applied Biosystems	Biología Molecular
Termociclador GeneAmp2400		
Biophotometer Plus 2233	Eppendorf	
Transiluminador Gel Logic 200 Imagin System	kodak	
Ultra-Turrax T-8 Basic	IKA	
Criostato Leica CM1850	Leica	Inmunohistoquímica
Portas y cubreobjetos	Thermo Scientific	
Microscopio Confocal Axiovert 200 M	Zeiss	
Módulo Confocal Pascal		
Cámara Axio Visio		
Matrx VIP 3000 Calibrated Vaporized	Midmark	Anestesia
Oxígeno Medicinal	Air liquid	
Tonometro de rebote TonoLab®	Tiolat-Oy	Presión Intraocular
Flexstation	Molecular Devices	Experimentos de Calcio
Campana de flujo laminar	NuAIRE	Cultivos celulares
Hemocitómetro	Assistant, Sondheim-Rhön.	
Incubador Hera Cell	Thermo Scientific	
Pipetas estériles (5, 10 y 25mL)		
Placas de 96 pocillos		
Flasks de 75cm³		
Microscopio LCD	Zeiss	
Centrífuga Heraeus™ Labofuge 400	DJB Labcare	Varios
Centrífuga refrigerada Kubota 6500		
Centrífuga de sobremesa Biofuge® pico		

### 1.3 Medios y tampones

Todos Los medios de cultivo, tampones y disoluciones generales se prepararon en agua desionizada de alta calidad y pureza obtenida con un equipo de filtración Milli-Q Water Purification System de Millipore. Las soluciones o muestras que debían mantenerse a 4°C se conservaron en frigoríficos Daewoo, Liebehrr y Bosch. A continuación, se muestra una tabla correspondiente a soluciones generales:

Tabla 7. Medios y tampones

TAMPONES/SOLUCIONES	COMPUESTOS
PBS 10X (pH=7.3)	1.37 mM NaCl; 81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 26.8 mM KCl; 14.7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS 1X (pH=7.3)	10% (v/v) PBS 10X; 90% (v/v) H <sub>2</sub> O
Solución de sacarosa para incluir tejidos (11%)	10% (V/V) PBS 10X; 11% (m/v) Sacarosa
Solución de sacarosa para incluir tejidos (33%)	10% (V/V) PBS 10X; 33% (m/v) Sacarosa
Tampón de lavados	0.1% (v/v) Tritón X-100; 10% (v/v) PBS 10X
Solución Bloqueo para inmunohistoquímica	90% (v/v) Tampón de lavados (PBS 1X-Tritón X-100 0.1%); 10% (v/v) Suero (NDS)
Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (pH=8.3)	40 mM Tris-base, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA
E TOTAL 10X (pH=7.3)	4,24g NaCl; 1,19g HEPES, 1,17 D-glucosa; 1 mM KCl; 2 mM CaCl <sub>2</sub> ; 1 mM MgCl

## 1.4 Material biológico.

### 1.4.1 Animales de experimentación

Para la realización de los experimentos in vivo, tales como la medida de la presión intraocular, las q-PCRs y la inmunohistoquímica se utilizaron dos modelos murinos, una cepa control y la otra glaucomatosa, siendo todas hembras. El motivo por el cual todos los animales utilizados en la experimentación de este trabajo fueron hembras se debe a que las hembras de la cepa glaucomatosa desarrollan antes las manifestaciones fenotípicas como la subida de la presión intraocular, además permanece elevada durante más tiempo de vida del animal (Libby et al., 2005).

Los animales fueron estabulados en jaulas de policarbonato, con comida y agua *ad libitum*, temperatura controlada y fueron sometidos a ciclos controlados de luz/oscuridad de 12 horas para evitar la influencia de los ciclos circadianos en las medidas de la presión intraocular.

Todos los protocolos realizados con los animales cumplieron la normativa europea (86/609/EEC) del Consejo de la Unión Europea sobre uso y manejo de

animales de experimentación, la declaración de “*ARVO Statement for Use of Animals in Ophthalmology and Vision Research*” y pasaron los comités de experimentación animal de la Universidad Complutense de Madrid y de la Comunidad de Madrid, siguiendo las pautas indicadas por el Consejo Internacional de Animales de Laboratorio (ICLAS).

- **Modelo animal control: Ratones C57BL/6J**

Los ratones de esta cepa se utilizaron como control en todos los experimentos realizados en este estudio. Fueron obtenidos del laboratorio europeo de Jackson Laboratories, Charles Rivers.

- **Modelo animal glaucomatoso: Ratones DBA/2J**

Los ratones DBA/2J desarrollan progresivamente glaucoma con la edad, causado por una dispersión pigmentaria de iris y atrofia estromal como resultado de mutaciones producidas en los genes *Gpnmb* y *Tyrp* (John et al., 1998; Libby et al., 2005; Howell et al., 2007). El acumulo de pigmentos en la malla trabecular de los ojos de estos ratones DBA pueden ocluir los espacios de la malla y producir que el drenaje del humor acuoso decaiga, dando lugar a una presión intraocular elevada. Fueron obtenidos del laboratorio europeo de Jackson Laboratories, Charles Rivers.



**Figura 11.** Imagen de los animales de experimentación.

En la imagen de la izquierda está representado el modelo de ratón glaucomatoso DBA/2J y en la imagen de la derecha está representado el modelo de ratón control C57BL/6J.



Tabla 8. Tamaño muestral de animales en función de los experimentos realizados

EXPERIMENTO	N DBA/2J	N C57BL/6J
Cambios en la PIO relacionados con la edad	32	32
Descripción de la presencia de receptores P2Y	3	3
Expresión de ARN mensajero	43	43
Inmunohistoquímica	20	20
Dosis respuesta del Ap <sub>4</sub> A (PIO)	15	15
Efecto del Ap <sub>4</sub> A con respecto al tiempo	14	14
Estudio de los antagonistas	15	15
Efecto a largo plazo del Ap <sub>4</sub> A	20	20
Efecto de la instilación tópica del Ap <sub>4</sub> A combinado con fármacos comerciales	6	6

### 1.4.2 Cultivo celular

Para el estudio de las células de polo posterior, se emplearon dos líneas celulares de cultivo celular inmortalizado ya establecidas. Una de ellas fue la línea celular de microglía de ratón BV2 cedidas por la Doctora Leanne Stockes, “*Pharmacy and Chemistry School, UEA*”, Norwich, Reino Unido. La otra fue la línea del epitelio pigmentario de la retina humana: las ARPE-19 que fueron obtenidas de “*American Type Culture Collection*” o ATCC, Manassas, VA, USA.

La línea murina celular de la microglía del BV2, se utiliza frecuentemente como un modelo alternativo de cultivo primario de microglía en cultivo celular ya que puede reproducir fielmente la interacción célula-célula (Henn et al., 2009). Dicha línea se mantuvo en medio de cultivo Dulbecco: Mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% 200 mM L-Glutamina. y 1% de antibiótico Penicilina-Streptomina.

La línea celular de las ARPE-19 se mantuvo en medio de cultivo DMEM de alto contenido en glucosa, suplementado con 10% de FBS, 1% 200 mM L-Glutamina. y 1% de antibiótico Penicilina-Streptomina.

Las dos líneas celulares fueron tratadas en las mismas condiciones: se almacenaron en flasks de 75 cm<sup>3</sup> (Nunc™ EasYFlask™, Thermo Scientific) y se conservaron en una atmósfera húmeda e incubadas a 37°C, con un 5% CO<sub>2</sub> en el incubador (*Incubator Hera Cell*).

Las células de la microglía BV2 alcanzaban la confluencia a los 2 o 3 días, mientras que las células ARPE-19 lo hacían a los 3 o 4 días. Todos los experimentos realizados se encontraban entre los pases 12 y 18 para evitar la desdiferenciación celular.

## 1.5 Programas y herramientas informáticas

**Tabla 9. Programas y herramientas informáticas**

HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	USO
Software LSM 5 Pascal (Zeiss)	Varios
Image J (National Institutes of Health)	Análisis de imágenes
Pubmed (National Institutes of Health)	Motor de búsqueda en bases de datos bibliográficas
GenBank EMBL (National Institutes of Health)	Base de datos para ácidos nucleicos
GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc.)	Hoja de cálculo/ Análisis de datos
Step One Plus AB 2.3 (Step One Software)	Análisis PCR
SoftMax pro (molecular devices)	Análisis de Calcio
SPPS 22.0 (SPSS Inc.)	Análisis estadístico
Granmo 6.0	Cálculo muestral

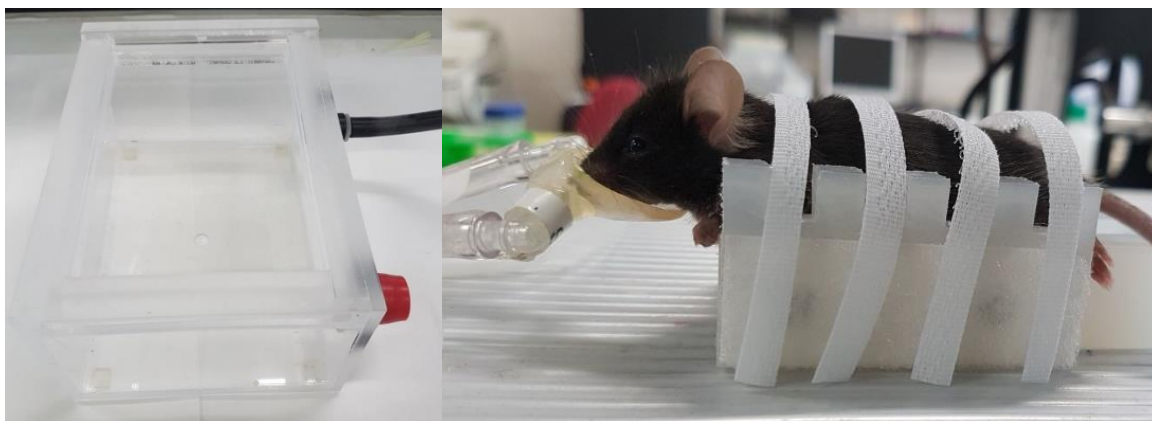
## 2. MÉTODOS

### 2.1 Medidas de presión intraocular

Todas las medidas de presión intraocular fueron realizadas con el tonómetro de rebote TonoLab® (Tiolat Oy, Helsinki). Este tonómetro está diseñado para medir la presión intraocular de los ratones y permite medir y monitorizar la PIO de una manera reproducible, fiable y sin causar ningún daño (Pease et al., 2011).

El tonómetro se colocó de manera fija, de forma que la sonda con la que se toman las medidas estaba alineada con el eje óptico del ojo de los ratones, a una distancia de 1-4 mm. En cada medida registrada de la PIO se realizaron 6 lecturas, de las cuales se descartaron las 2 más atípicas y fue con los 4 restantes con las que se realizó la media que se registró de cada medida y los posteriores análisis estadísticos (Figura 12).

Para evitar el efecto putativo del ritmo circadiano, la presión intraocular fue medida siempre a la misma hora del día.



**Figura 12. Cámara de sedación ratones.**

Tras la sedación en la cámara se procede a colocar el animal en un soporte que posee un cono nasal para la liberación del isoflurano durante los experimentos de medidas de presión intraocular.

Los animales fueron anestesiados de forma superficial, sin estar en ningún momento en un plano quirúrgico, con anestesia inhalatoria isoflurano (IsoFlo,

Abbot). El aporte de oxígeno al animal durante la sedación se suministraba desde una bala de 3515-3867 gr/cm<sup>2</sup>. Se utilizó el aparato de anestesia Matrx VIP 3000 Calibrated Vaporized de Midmark. El isofluorano se mezclaba con el oxígeno y desde el aparato se enviaban dos flujos a 500 cc/minuto, liberando finalmente el 2,5% de isofluorano en oxígeno al animal. Los animales se colocaban inicialmente en una caja de metacrilato para la sedación inicial y después de aproximadamente dos minutos, el animal sedado se colocaba en su posición para la medida de la presión intraocular, manteniendo su sedación a través de un cono nasal que liberaba la mezcla de isofluorano/oxígeno. El cono de la nariz permitía perfectamente el acceso a los ojos.



**Figura 13. Equipo de anestesia superficial con isofluorano.**

**Bomba desde la cual se regulaba el flujo de anestésico inhalatorio que llegaba a los animales de estudio y el nivel de oxígeno**

### **2.1.1 Monitorización de la evolución de la presión intraocular**

Para comprobar la subida de la presión intraocular en los ratones glaucomatosos y a su vez verificar que los ratones control no experimentaban esta subida durante el crecimiento, la monitorización se llevó a cabo tomando medidas de PIO semanales tanto de los ratones DBA/2J como de los ratones C57BL/6J. En total, se monitorizó la presión intraocular de 32 animales.

Estas medidas de PIO se realizaron siempre a la misma hora del día, comenzando a monitorizar desde los tres hasta los doce meses de edad de ambas cepas de ratón, procediendo a medir la presión intraocular como se ha comentado con anterioridad en metodología.

### **2.1.2 Monitorización de la presión intraocular durante la evolución de la patología y la aplicación de tratamiento**

Fueron seleccionados un total de 20 ratones, divididos en dos grupos. Uno de los grupos incluía a 10 ratones DBA/2J y el otro grupo a 10 ratones C57BL/6J, permitiéndonos así comprobar el posible efecto preventivo que podía tener la aplicación tópica de Ap<sub>4</sub>A sobre estos animales. A su vez, otra selección de 20 ratones (10 DBA/2J y 10 C57BL/6J) fueron elegidos controles, a los cuales se les trataba aplicando solución salina 0.9% de forma tópica también.

Durante el quinto y el sexto mes de edad de todos los animales que participaron en este estudio, se tomaron medidas basales para llevar a cabo la monitorización de la presión intraocular, observando el efecto del Ap<sub>4</sub>A sobre la presión en relación con la edad de los animales, y por tanto del desarrollo de glaucoma en los ratones de la cepa DBA/2J. Pasado este tiempo, los animales fueron divididos de forma aleatoria en controles o tratados con Ap<sub>4</sub>A.

Una vez comprobado el efecto hipotensor del Ap<sub>4</sub>A, aplicamos el dinucleótido tres veces a la semana, desde los seis hasta los nueve meses de edad, midiendo la presión intraocular una vez a la semana y comparándola con los valores de su grupo control (aquellos que fueron tratados con solución salina al 0.9%).

## **2.2 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS EN RATONES**

Para la realización de los diferentes estudios farmacológicos se emplearon un total de 100 animales. Siendo distribuidos en los diferentes experimentos tal y como se explica en la tabla 8, apartado 1.4.1 de materiales y métodos.

En todos los casos, los animales fueron tratados tópicamente con el mismo volumen, 2  $\mu$ L tanto de la sustancia a estudiar como de la solución salina, en todos los ensayos realizados. Los fármacos fueron aplicados en los dos ojos de los ratones, es decir, de manera bilateral.

Durante la preparación de los compuestos, todos fueron formulados siempre desde solución salina estéril al 0.9%, a excepción de aquellos que no eran solubles en solución salina y que fueron disueltos inicialmente en DMSO y diluidos en solución salina estéril al 0.9%, hasta alcanzar una concentración final de 0.01%.

### **2.2.1 Estudio del efecto de la instilación tópica del Ap<sub>4</sub>A a corto y largo plazo**

Con el fin de comprobar el efecto hipotensor del Ap<sub>4</sub>A por su actuación sobre los receptores P2Y, se realizaron diferentes experimentos. En todos los casos se instilaron 2  $\mu$ L de este dinucleótido a una concentración fija de 100  $\mu$ M, para los estudios del efecto temporal (seis horas de medidas de PIO o *Time-Course*).

### **2.2.2 Dosis respuesta del Ap<sub>4</sub>A**

El Ap<sub>4</sub>A fue instilado en un amplio rango de concentraciones, que iban desde 10<sup>-8</sup> M hasta 10<sup>-3</sup> M para poder comprobar el efecto que tenía el dinucleótido sobre la presión intraocular, en función de su concentración. La presión intraocular fue medida tres horas después de instilar el Ap<sub>4</sub>A, debido a que era a este tiempo donde se encontraba el efecto máximo hipotensor del compuesto.

### **2.2.3 Relación de los receptores purinérgicos y la presión intraocular**

En los estudios en los que se quiso evaluar el efecto de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>, los antagonistas testados para comprobar su implicación fueron instilados (2  $\mu$ L) tópicamente a una concentración fija de 100  $\mu$ M. Los antagonistas utilizados en estos experimentos fueron el MRS2179 como antagonista de P2Y<sub>1</sub>, un

coctel de suramina, PPADS y RB-2 como antagonista del P2Y<sub>2</sub> y el MRS2578 como antagonista de P2Y<sub>6</sub>.

Dichos compuestos fueron instilados media hora antes que el Ap<sub>4</sub>A, y las medidas de la presión intraocular se llevaron a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito en el apartado 2.1.2.

## 2.3 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN RATONES

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo mediante cuantificación relativa de la expresión del ARNm de interés realizando para ello análisis de la q-PCR o PCR cuantitativa en tiempo real. Estos experimentos fueron utilizados para estudiar la expresión génica de los receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>.

### 2.3.1 Obtención de la muestra

Todos los experimentos de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o PCR cuantitativa se realizaron a partir de tejido de iris y procesos ciliares de las dos cepas de ratón, DBA/2J y C57BL/6J, recogido en los estadíos de 3, 6, 9 y 12 meses de edad, siendo el número total de animales utilizados fue de 86, (43 ratones DBA/2J y 43 ratones C57BL/6J). La manipulación del ARN tuvo lugar en todo momento en condiciones libres de ARNsas. El procedimiento de extracción de ARN se realizó con un kit cuyo fundamento está basado en la capacidad de unión del ARN a una columna de gel de sílice en presencia de una elevada concentración de sales (*SpeedTools Total RNA Extraction Kit, Biotools*). Se utilizaron 600 µL de tampón desnaturizante (β-mercaptoheptanol y buffer RL) para obtener el lisado del tejido. Para ayudar al lisado del tejido, las muestras se pasaron durante unos segundos por el homegenizador-dispersador Ultraturrax® T-8 basic. De esta forma se puede liberar el contenido celular a la vez que se consigue una rápida inactivación de las ARNasas endógenas, evitando así la degradación del ARN presente en el lisado. A continuación, se añadió un volumen igual de etanol al 70% para conseguir las condiciones óptimas de la unión y eliminar los restos de membranas celulares y la mayor parte del ovillo de ADN cromosómico. Para la

unión del ARN a la columna se cargó la muestra anterior en una columna de unión y se centrifugó 30 segundos a 11.000 g. Se eliminaron las sales de la membrana de sílice añadiendo a la columna 350 µL de buffer DBR y se centrifugó 1 minuto a 11.000 g. Se procedió a la digestión del ADN in situ añadiendo 95 µL de la mezcla de la reacción de la DNasa (10µL rDNase + 90µL de buffer para rDNase) y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente. Pasados estos 15 minutos se realizó el lavado y secado de la membrana, mediante un lavado con el buffer WR1 (30seg a 11.000g) y dos lavados con el buffer WR2 (30 segundos y 2 minutos a 11.000 g). Para terminar, se eluyó el ARN puro, añadiendo 40 µL de agua libre de RNasas, centrifugándolo durante 1 minuto a 11.000 g.

Después de cada extracción y de forma rutinaria las muestras de ARN se trataron con ADNasa RQ1 de acuerdo con el kit Turbo DNA free (Ambion) para eliminar la posible contaminación del ARN con ADN genómico, durante 30 min a 37°C. A continuación, se añadió el reactivo de inactivación de ADNasa y se centrifugó a 10.000 g, recogiendo el sobrenadante que contiene el ARN.

### **2.3.2 Determinación de la concentración y del grado de pureza del ARN extraído**

La concentración del ARN extraído de cada muestra fue medida mediante el biofotómetro de Eppendorf, tomando las absorbancias a 260 nm.

El grado de pureza del material extraído se estimó a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra medida a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) el cual, para una disolución de ARN puro debe tener un valor igual o muy próximo a 2.

### **2.3.3 Reacción de la transcriptasa inversa (RT)**

La síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir del ARN total extraído de la muestra correspondiente se llevó a cabo añadiendo en el tampón de la reacción (para un volumen final de 50 µL) por tubo: 1.25 U/mL de transcriptasa inversa, oligo (dT) 16 2.5 mM, 0.5 U/mL de inhibidor de ARNasa,  $MgCl_2$  5.5 mM, la mezcla de dATP/dCTP/dGTP/dUTP (0.5 mM cada uno), todo en el kit TaqMan® RT



reagents de Applied Biosystems, y 1 mg de ARN purificado. La transcripción inversa se realizó durante 90 minutos a 37°C, seguida de una incubación a 70°C durante 15 minutos con el fin de inactivar la retrotranscriptasa. Además, para cada nueva muestra de ARN se realizó una reacción de RT en la que no se añadió la transcriptasa inversa, para comprobar si existía contaminación con ADN genómico en la muestra. Así, en todo momento teníamos la seguridad de que los fragmentos amplificados en cada reacción correspondían a secuencias del ARNm presente en el tejido. Todas las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp 2400 de Applied Biosystems.

### **2.3.4 Preamplificación por PCR a tiempo real**

Debido al escaso material genético que obteníamos al hacer la extracción del mRNA, tuvimos que llevar a cabo un paso previo para poder obtener una buena amplificación para poder cuantificar posteriormente. En este caso consistió en hacer una preamplificación de nuestras muestras para cada uno de los genes de estudio. En las reacciones de PCR se utilizó la ADN polimerasa AmpliTaq Gold® en presencia de 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, la mezcla de dNTPs (0,2 mM cada uno) y 5 µL del producto de la transcriptasa inversa explicada en el apartado anterior, con un volumen final total de 25 µL.

Para ello, de la muestra obtenida en la retrotranscripción inversa llevamos a cabo una PCR a tiempo real con las siguientes características: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; 14 ciclos de amplificación a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos, finalizando con 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos. Los oligonucleótidos para los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, y P2Y<sub>6</sub>, así como los del control endógeno gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fueron comerciales. Las preamplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp 2400 de Applied Biosystems.

### 2.3.5 Amplificación por PCR a tiempo real

Para asegurar la presencia de los receptores purinérgicos de estudio durante la presente tesis, en iris y procesos ciliares, primero se llevó a cabo la amplificación de estos por medio de la realización de la PCR a tiempo real. En las reacciones de PCR se utilizó la ADN polimerasa AmpliTaq Gold® en presencia de 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, la mezcla de dNTPs (0,2 mM cada uno) y 5µL del producto de la transcriptasa inversa explicada en el apartado anterior, con un volumen final total de 25 µL.

En todos los casos, la reacción de amplificación se inició incubando la mezcla a 95°C durante 10 minutos para la activación de la DNA polimerasa AmpliTaq Gold®, y a continuación se repitieron 40 ciclos en las condiciones de desnaturalización, anillamiento y elongación (95°C, 60 segundos; 60°C 45 segundos; 72°C, 45 segundos). Una vez completado el número total de ciclos, se realizó un paso de extensión final manteniendo la mezcla durante 7 minutos a 72°C para facilitar la completa elongación de todos los fragmentos amplificados durante la reacción de PCR. Cada reacción de PCR se realizó en paralelo con un control sin ADNc molde. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp 2400 de Applied Biosystems.

Los productos obtenidos de esta amplificación de cada receptor se separaron e identificaron en un gel de agarosa al 3% (en tampón TAE 1X) y teñidos con la sonda Syber Safe (Molecular Probes) que se une al cDNA y se ve en luz ultravioleta. Como marcadores de tamaños moleculares conocidos utilizamos los patrones *Gene ruler* de 100 pares de bases y *Gene ruler* de 1 Kb. Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron mediante el sistema de captación de imágenes Gel Logic 200 Imagin System (Kodak) con luz ultravioleta.

### 2.3.6 PCR cuantitativa en tiempo real

Este método permite detectar la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de la reacción. El uso de esta técnica para cuantificar el material genético de una muestra está basado en la relación directa que existe

entre la cantidad de ADN molde inicial y el producto que se amplifica a partir del mismo. De esta forma a mayor cantidad de ADN molde, más temprana será la aparición del producto amplificado. El producto que se utilizó para realizar estas PCR cuantitativas en tiempo real fue el obtenido a partir de la preamplificación explicada en el apartado 2.3.4.

El seguimiento del proceso de amplificación se realiza mediante el uso de sistemas de marcado fluorescente que permiten detectar los productos que se van sintetizando durante el transcurso de la reacción. Así, la cantidad de fluorescencia emitida por el producto en cuestión se incrementa en cada ciclo de amplificación.

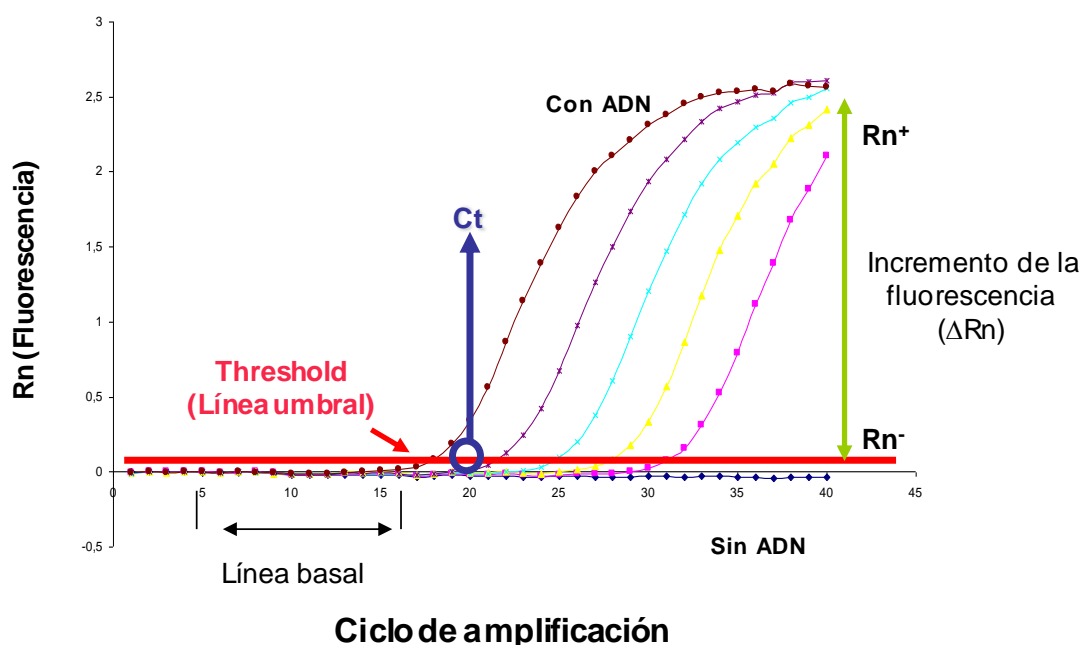


Figura 14. Representación esquemática de la amplificación que tiene lugar durante la q-PCR.

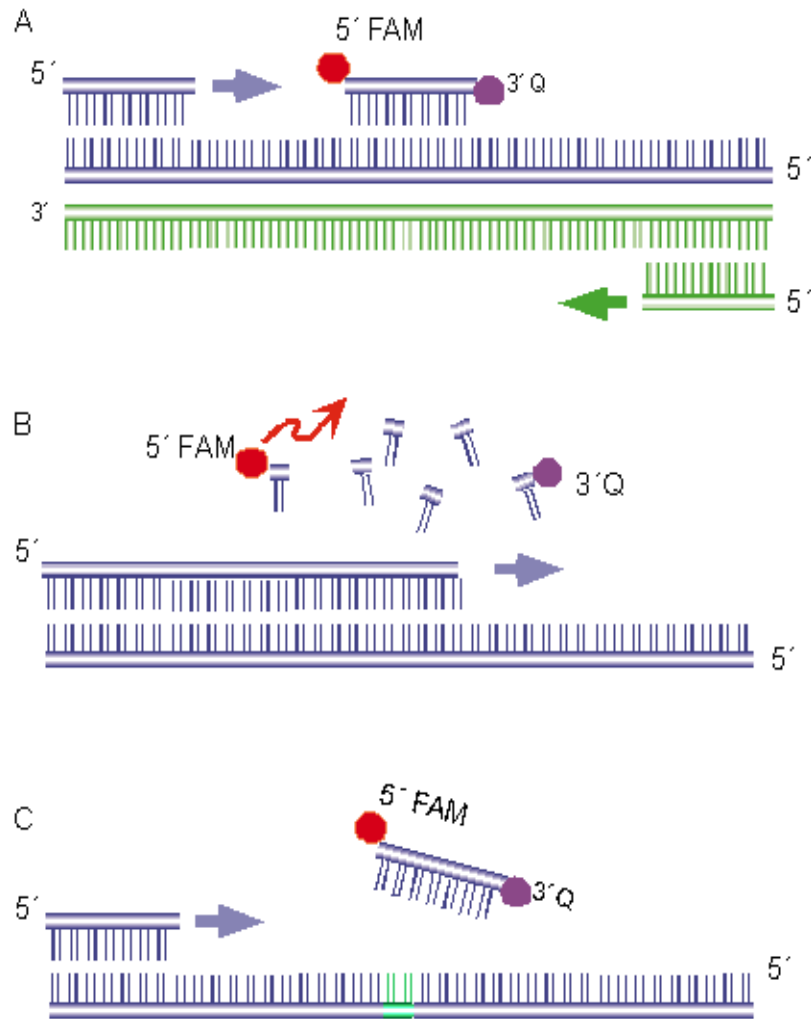


Figura 15. Esquema de los sucesos que tienen lugar durante el desarrollo de una Q-PCR.

La sonda hibrida de forma específica con el amplicón deseado en una región interna del mismo, el cual queda localizado entre los cebadores sentido y antisentido. La sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo reportero FAM y en el extremo 3' con un apagador o “quencher” que absorbe la emisión de fluorescencia del extremo 5'. Durante el proceso de extensión de la cadena que se está sintetizando, la ADN polimerasa termoestable con actividad 5'-3' exonucleasa hidroliza la sonda en su extremo 5'. De esta forma el reportero se libera, la fluorescencia que emite no es absorbida por el apagador y su emisión es detectada por el termociclador.

La reacción se lleva a cabo en termocicladores diseñados con un sistema capaz de monitorizar y cuantificar la señal de fluorescencia emitida. Existen diversos sistemas de marcaje fluorescente que permiten la detección y cuantificación en las reacciones de PCR a tiempo real. Uno de los más utilizados es el sistema con sondas de hibridación TaqMan®. Este sistema se basa en la utilización de un tercer oligonucleótido (sonda) que hibrida de forma específica con el amplicón deseado en una región interna del mismo, el cual queda localizado

entre los cebadores sentido y antisentido. La sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo (*reporter*) que requiere una luz de excitación de alta energía y en el extremo 3' con otro fluoróforo diferente (*quencher*), que requiere una luz de excitación de baja energía y que absorbe la emisión de fluorescencia del extremo 5'. Por tanto, cuando la sonda está intacta no emite señal fluorescente.

Al inicio de la reacción de PCR, los dos oligonucleótidos y la sonda hibridan en la región diana de ADN molde y la Taq DNA polimerasa comienza el proceso de amplificación. Durante el proceso de extensión de la cadena que se está sintetizando, la ADN polimerasa termoestable, por su actividad 5'-3' exonucleasa, hidroliza la sonda en su extremo 5'. De esta forma el fluoróforo *reporter* se libera, la fluorescencia que emite no es extinguida por el *quencher* y su emisión puede ser detectada por el sistema. Los fragmentos de sonda son entonces desplazados del molde y la polimerización de la nueva cadena continúa. La extensión de la sonda durante el proceso de síntesis se evita al estar su extremo 3' bloqueado. El proceso de hibridación e hidrólisis de la sonda ocurre en cada ciclo y no interfiere en la acumulación exponencial del producto.

La acumulación de los productos amplificados durante la PCR se detecta monitorizando el aumento de fluorescencia que se produce como consecuencia de la liberación del fluoróforo situado en el extremo 5' de la sonda. A medida que los ciclos de la reacción avanzan, aumenta el número de copias de producto generado, por lo que la intensidad de la fluorescencia emitida aumentará también de forma proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado. El termociclador detecta el incremento de fluorescencia ( $\Delta R$ ) y lo representa frente al número de ciclos de la PCR. Durante los primeros ciclos de amplificación no hay incremento de fluorescencia ya que es necesario que se acumule una cantidad mínima de producto amplificado para que la fluorescencia detectada por el sistema sea significativamente distinta del valor de fluorescencia basal. El ciclo de PCR en el que se acumula suficiente producto amplificado y el valor de fluorescencia se eleva por encima de la fluorescencia basal, se define como ciclo umbral o Ct (*Cycle threshold*). El valor del Ct es proporcional al logaritmo de la cantidad inicial de ADN molde.

Las reacciones de RT-PCR cuantitativa se realizaron usando el sistema StepOne Plus Real Time PCR de Applied Biosystems utilizando el kit de amplificación LuminoCt® qPCR Ready Mix™ de Sigma.

El ensayo de amplificación se llevó a cabo en placas multipocillo en un volumen final de 25 µL, conteniendo 12.5 µL de la mezcla LuminoCt® Qpcr Ready Mix™ (incluye los dNTPS, tampón de reacción y AmpliTaq Gold® polimerasa), 1.25 µL de cada cebador y sonda correspondiente, 2.5 µL de ARNt ([30 ng/mL]f), 0.25 µL de colorante de referencia pasiva (Moreno et al.), 1 µL de agua ultrapura estéril, y 5 µL del ADNc obtenido tras las RT y su posterior pre-amplificación, diluido al 20%. La reacción se desarrolló en un programa de 2 pasos: una incubación inicial a 95°C durante 20 segundos para la activación de la polimerasa seguida de 40 ciclos de amplificación: (1 segundo de desnaturalización a 95°C y 20 segundos de hibridación a 60°C).

La cuantificación de los genes se realizó mediante extrapolación en una recta patrón. Para la realización de la recta patrón hicimos diluciones seriadas de un producto amplificado por una PCR clásica que suponemos posee alrededor de 1012 copias del fragmento de estudio. En la curva patrón se representa el logaritmo del número de copias obtenido de cada dilución del gen de interés con el valor de Ct obtenido tras la amplificación. En todo momento se trabajó con curvas patrones cuyos coeficientes de correlación eran mayores de 0,98 y que daban una eficiencia de amplificación cercana al 100% para todos los genes. Como control interno de la cantidad total de ADNc añadida se utilizó el gen de expresión constitutiva GAPDH. Finalmente, los resultados se expresaron como aumento o disminución de la expresión con respecto a la condición control, en ausencia de estimulación.

## 2.4 INMUNOHISTOQUÍMICA

Los estudios de localización de las proteínas expresadas por los receptores de estudio (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>) se llevaron a cabo mediante estudios de

inmunohistoquímica en los procesos ciliares de los ojos de los ratones DBA/2J y C57CL/6J de edades comprendidas entre los 3 y los 12 meses de edad.

### **2.4.1 Obtención de las secciones de los procesos ciliares**

Se emplearon un total de 40 animales (20 DBA/2J y 20 C57BL/6J) para la obtención de muestras de procesos ciliares. Los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de Dolethal Vetoquinol® y perfundidos pericárdicamente con PBS y con paraformaldehído en PBS 0.1 M.

Tras la perfusión, se enuclearon los ojos y fueron fijados mediante inmersión en PFA al 4% durante 1 hora a 4º. Las manipulaciones microquirúrgicas se efectuaron con la ayuda de un microscopio quirúrgico instalado sobre una columna S-21 (Carl Zeiss, S.A.) y con el instrumental de microcirugía apropiado. Se diseccionaron pasado este tiempo, conservando el polo anterior del ojo ya que es donde se encuentran los procesos ciliares. Se llevó a cabo la crioprotección del polo anterior, sumergiéndolo en una solución de sacarosa al 11% en PBS durante un mínimo de 12 horas para a continuación sumergirlos en una solución de sacarosa al 33% en PBS 1X a 4ºC durante toda la noche, el tiempo suficiente para poder preservar el tejido del deterioro ocasionado por la formación de cristales de agua durante el proceso de congelación.

Una vez pasado el tiempo sumergidos en sacarosa para completar la crioprotección, se incluyeron en un molde de relleno de medio para la congelación (Tissue-Tek® O.C.T. Compound®), que nos sirvió para realizar los cortes histológicos. Estos bloques con los ojos incluidos en el medio de congelación se guardaron a -80ºC hasta que fueron cortados con el criostato.

Antes de proceder a realizar las secciones histológicas correspondientes, los bloques se dejaron aproximadamente 1 hora en el criostato para que alcanzasen la temperatura óptima de corte. Se realizaron secciones longitudinales de 10 µm de grosor de los ojos en un criostato Leica, se recogieron en portaobjetos de y se guardaron a -20ºC hasta el momento de su utilización.

## 2.4.2 Inmunofluorescencia del tejido

Las criosecciones de los procesos ciliares se atemperaron durante unos 45 minutos, y a continuación se hidrataron con PBS 1X durante 10 minutos. Posteriormente las muestras fueron permeabilizadas (PBS 1X-TritonX10 al 0,25%), para facilitar el acceso de los anticuerpos a todo el tejido, durante media hora. A continuación, fueron incubadas durante una hora con la solución de bloqueo e inmediatamente después incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a -4°C en oscuridad.

Tras la incubación del anticuerpo primario, y los lavados correspondientes, se procedió a la incubación en cámara oscura durante una hora del anticuerpo secundario diluido en PBS Tritón X-100 (0.1%). El anticuerpo secundario utilizado se muestra en la tabla 10.

Pasado ese tiempo, y después de realizar lavados, se incubaron las muestras durante 10 minutos con yoduro de propidio (Li et al.) (dilución 1:500), lo cual nos permitió poder ver los núcleos celulares. Finalmente, los portaobjetos con nuestras secciones fueron montados con los cubreobjetos con la ayuda del medio de montaje con propiedades protectoras Vectashield (Vector Laboratories, Palex Medical). Se protegieron de la luz y se guardaron a 4°C.

**Tabla 10. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia del tejido.**

ANTICUERPO	DILUCIÓN	PROVEEDOR
Rabbit polyclonal anti-P2Y <sub>2</sub>	1:100	Alomone
Goat polyclonal anti-P2Y <sub>1</sub>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Goat polyclonal anti-P2Y <sub>6</sub>	1:75	Santa Cruz Biotechnology
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)	1:200	Jackson ImmunoResearch



### 2.4.3 Procesado de las imágenes

Las secciones transversales de los procesos ciliares fueron observadas y fotografiadas a través un microscopio confocal. Este microscopio está equipado con dos filtros: uno que permite poder observar los anticuerpos conjugados con FITC y Alexa Flúor®488 (el filtro de fluorescencia BP 505-530) y otro que permite observar la fluorescencia roja de los núcleos de las muestras de tejido (el filtro de rodamina LP 560). El microscopio además tiene integrada una cámara digital de alta resolución, y todo ello estaba monitorizado a través del programa LSM 5 Pascal de Zeiss.

La realización de las fotos y el fotomontaje de las secciones se realizaron utilizando el objetivo de 40x (PlanNeofluar 40x/1.30; Zeiss, Jena, Alemania).

## 2.5 ESTUDIOS *IN VITRO*

En este apartado se describen los experimentos llevados a cabo las líneas celulares mencionadas en el apartado anterior. Los experimentos llevados a cabo se realizaron siguiendo el mismo protocolo tanto para las células de la microglía como para las células ARPE-19. Se estudió la liberación de calcio intracelular en presencia de agonistas y antagonistas de los receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>.

La cantidad de las células sembradas para los experimentos fue de 6000 cel/pocillo en 100 µL del medio empleado para cada tipo celular. Las placas de 96 pocillos estaban cubiertas por Poli-D-Lisina.

### 2.5.1 Estudio de la liberación de calcio al medio intracelular por la activación del $\text{Ap}_4\text{A}$ de receptores $\text{P}_2\text{Y}$

Para llevar a cabo la determinación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de agonistas de receptores  $\text{P}_2\text{Y}$  en las dos líneas celulares de estudio, se utilizaron técnicas de fluorimetría basadas en la utilización de sondas fluorescentes permeables a las células. La medida de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  se llevó a cabo en la plataforma Flexstation.

En dicha plataforma se introdujeron las placas de 96 pocillos donde se encontraban las células de estudio, las cuales eran previamente incubadas con 20  $\mu\text{L}$  de la sonda fluorescente Fura-2 AM con una concentración de 2  $\mu\text{M}$ , durante 45 minutos a una temperatura de 37°C. Esta sonda es un compuesto poliamónico que se une al  $\text{Ca}^{2+}$  de forma específica y es capaz de atravesar la membrana plasmática de las células. Se forma un complejo entre la sonda Fura-2 AM y el calcio libre en el citosol, y este complejo da lugar a una fluorescencia con un máximo a una longitud de onda de 510 nm, al tiempo que se produce el desplazamiento del espectro de excitación de 280 a 340 nm. Para evitar que salga al medio extracelular el complejo formado por la sonda y el calcio añadimos al buffer de carga, que contiene 10 mL de HBSS y 20  $\mu\text{L}$  de Fura-2 AM, 100  $\mu\text{L}$  de sulfinpirazona a una concentración de 250  $\mu\text{M}$ .

Una vez introducidas, en la parte media de la plataforma se colocaba otra placa de 96 pocillos donde estaban las distintas concentraciones del  $\text{Ap}_4\text{A}$ , el cual era inyectado a un tiempo fijo para la posterior lectura de la fluorescencia (se inyectaban 20  $\mu\text{L}$ ) Las concentraciones se prepararon en el buffer E-Total 10X y la concentración final a la que eran inyectadas fue de 1X. Para proceder a la obtención de la fluorescencia que nos identificaría la cantidad de calcio liberado, se estimulaba a las células con dos longitudes de onda 340 nm y 380 nm. La selección de estas longitudes de onda corresponde a los máximos de los registros de fluorescencia de soluciones de Fura-2 saturadas de calcio (340) y Fura-2 libre de

calcio (380). Dentro del Flexstation las células permanecían a la misma temperatura (37°C).

Los registros de fluorescencia de los experimentos realizados para el estudio de los receptores fueron la variación de la fluorescencia ( $F_{340}/F_{380}$ ) en relación al tiempo. Las medidas se tomaban cada segundo desde 0 hasta 300 segundos. Antes de calcular la razón entre ambas longitudes de onda, se sustrajeron los valores de fluorescencia basal de cada una de las imágenes recogidas para cada longitud de onda. Todos los datos obtenidos estuvieron controlados por un ordenador con el software SoftMax Pro.

### **2.5.2 Estudio de la liberación de calcio al medio intracelular en presencia de antagonistas de receptores P2Y**

La cuantificación de la liberación de calcio en presencia de antagonistas se lleva a cabo en la plataforma Flexstation, siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior 2.5.1.

Las placas de 96 pocillos se incuban con la sonda Fura-2 AM durante 45 minutos a una temperatura de 37°C. La principal diferencia con el procedimiento anterior fue que las placas de 96 pocillos fueron tratadas con los antagonistas selectivos de los receptores de estudio. Para ello se retiraba el medio de carga y se añadían 180µL del buffer E-Total en combinación con los antagonistas de los receptores P2Y: El MRS2179 antagonista del receptor P2Y<sub>1</sub>, AR-C como antagonista del receptor P2Y<sub>2</sub> y MRS2578 como antagonista del receptor P2Y<sub>6</sub>.

## 2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos presentados en esta memoria se representan como la media aritmética y el error estándar de la media (media  $\pm$  s.e.m). Los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., USA), y el análisis estadístico se realizó con el software SPSS 22.0 para Windows (SPSS, Inc., EE. UU.).

Las técnicas estadísticas empleadas se utilizaron en función de los grupos a analizar y el tipo de prueba realizada.

El test de ANOVA de las dos vías para muestras independientes, junto con el post test de Sidak (para la corrección de la comparación múltiple) se pudo aplicar cuando las muestras cumplían la normalidad (test de normalidad ómnibus de D'Agostino y Pearson) y la comparación debía efectuarse entre grupos independientes.

En todos los experimentos con animales se realizó el cálculo del tamaño muestral. Para ello se utilizó el programa estadístico Granmo 6.0, asumiéndose un riesgo alfa de 0.05, una potencia estadística del 80% y una relación entre grupos 1:1, obteniéndose un resultado de al menos 8 animales por grupo.

Los niveles de significación establecidos han sido:  $p < 0.001$ , diferencia extremadamente significativa (\*\*\*) ;  $p < 0.01$ , diferencia muy significativa (\*\*);  $p < 0.05$ , diferencia significativa (\*). Los niveles superiores a 0.05 se han tomado como no significativos (ns).



# Resultados



## RESULTADOS

### Objetivo 1: Describir la progresión de la presión intraocular en los animales glaucomatosos DBA/2J

Los estudios de presión intraocular se iniciaron en base a la experiencia previa de nuestro grupo de investigación, el cual había demostrado el efecto hipotensor de ciertos nucleótidos. En base a nuestra hipótesis, debíamos empezar por caracterizar el modelo animal glaucomatoso.

A partir de los resultados obtenidos se realizaron diferentes experimentos para caracterizar los receptores P2Y de interés en el presente trabajo, a nivel de los procesos ciliares de un modelo murino de glaucoma.

#### 1.1 Cambios en la presión intraocular relacionados con la edad y con el desarrollo de la patología

Para comprobar la evolución de la presión intraocular durante el desarrollo de la patología del glaucoma en los animales DBA/2J se realizó un seguimiento tomando medidas y comparando posteriormente la presión intraocular obtenida tanto en los ratones control C57BL/6J y los ratones glaucomatosos DBA/2J desde los 3 meses hasta que alcanzaron los 12 meses de edad. Las medidas se realizaron cada 3 meses. En los ratones DBA/2J la presión intraocular inicial, a los 3 meses, fue de  $16.3 \pm 0.8$  mmHg, se incrementó hasta llegar a un  $22.5 \pm 0.4$  mmHg a los 9 meses, alcanzando un máximo de  $26.2 \pm 0.7$  mmHg a los 12 meses de edad, es decir, la PIO se vio incrementada en un  $155.4 \pm 7.3$  % comparándola con la presión intraocular basal. En los ratones C57BL/6J la PIO se mantuvo estable en el tiempo (Fig. 16).



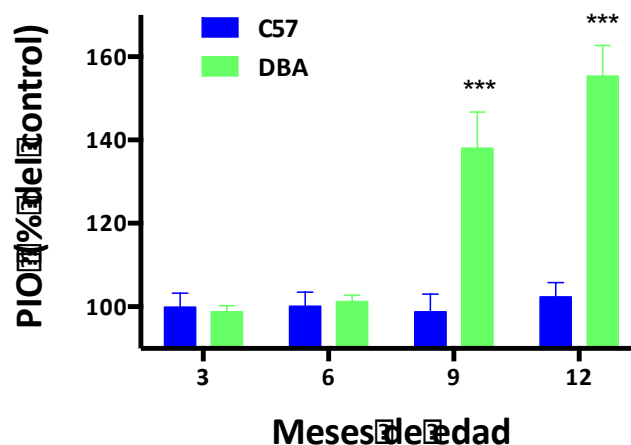


Figura 16. Medidas de la PIO en los ratones DBA/2J y C57BL/6J desde los 3 meses hasta los 12 meses de edad

Se expresa como el porcentaje sobre el control para ambos animales. Mientras que la PIO en los ratones control se mantiene estable (color azul oscuro), la PIO en los ratones glaucomatosos sufren una subida de esta (color verde) (n=32, \*\*\*p<0.001. Test de ANOVA de dos vías con post-test de Tukey).

## Objetivo 2: describir y demostrar la presencia de receptores purinérgicos de estudio en los procesos ciliares del modelo animal glaucomatoso DBA/2J

Una vez finalizado el seguimiento de la evolución de la patología en los animales de estudio y verificado que en los animales control la PIO se mantiene constante a lo largo de toda su vida, quisimos comprobar la presencia de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> en los procesos ciliares de ambas cepas.

Para ello, se llevaron a cabo distintas técnicas de laboratorio como la cuantificación de ARN mensajero mediante PCR o la visualización de los receptores en el microscopio confocal mediante técnicas de inmunohistoquímica. Ambos experimentos se realizaron cuando los animales tenían 3 meses de edad.

## 2.1 Medidas de expresión del ARN mensajero de los receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>.

Para comprobar la presencia de los receptores en los procesos ciliares del ratón control se realizó una primera PCR en tiempo real o RT-PCR. Los pesos moleculares de las bandas fueron de aproximadamente 100 bp y fueron amplificados de los extractos de ARNc obtenido a partir de la retrotranscripción de ARN total de los procesos ciliares de los ratones C57BL/6J. No aparecieron productos de amplificación en los ensayos que contenían agua (Control o molde).

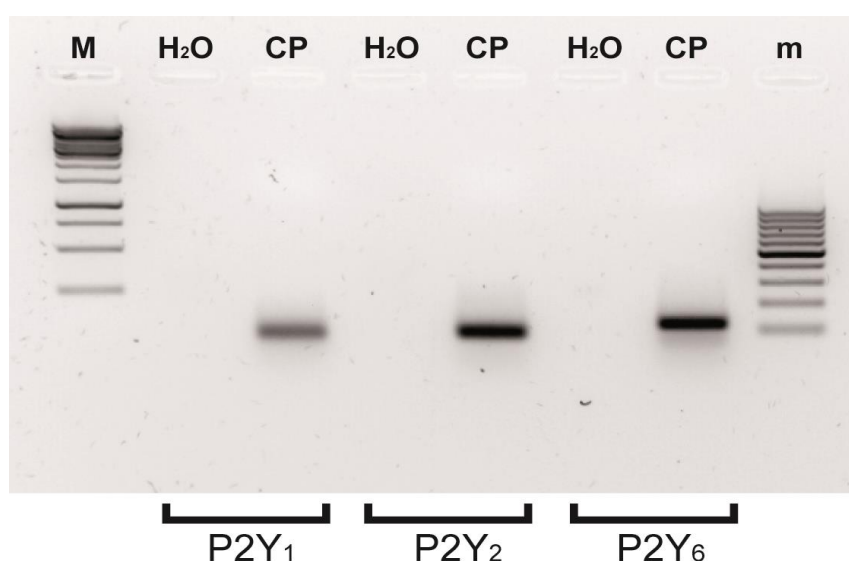
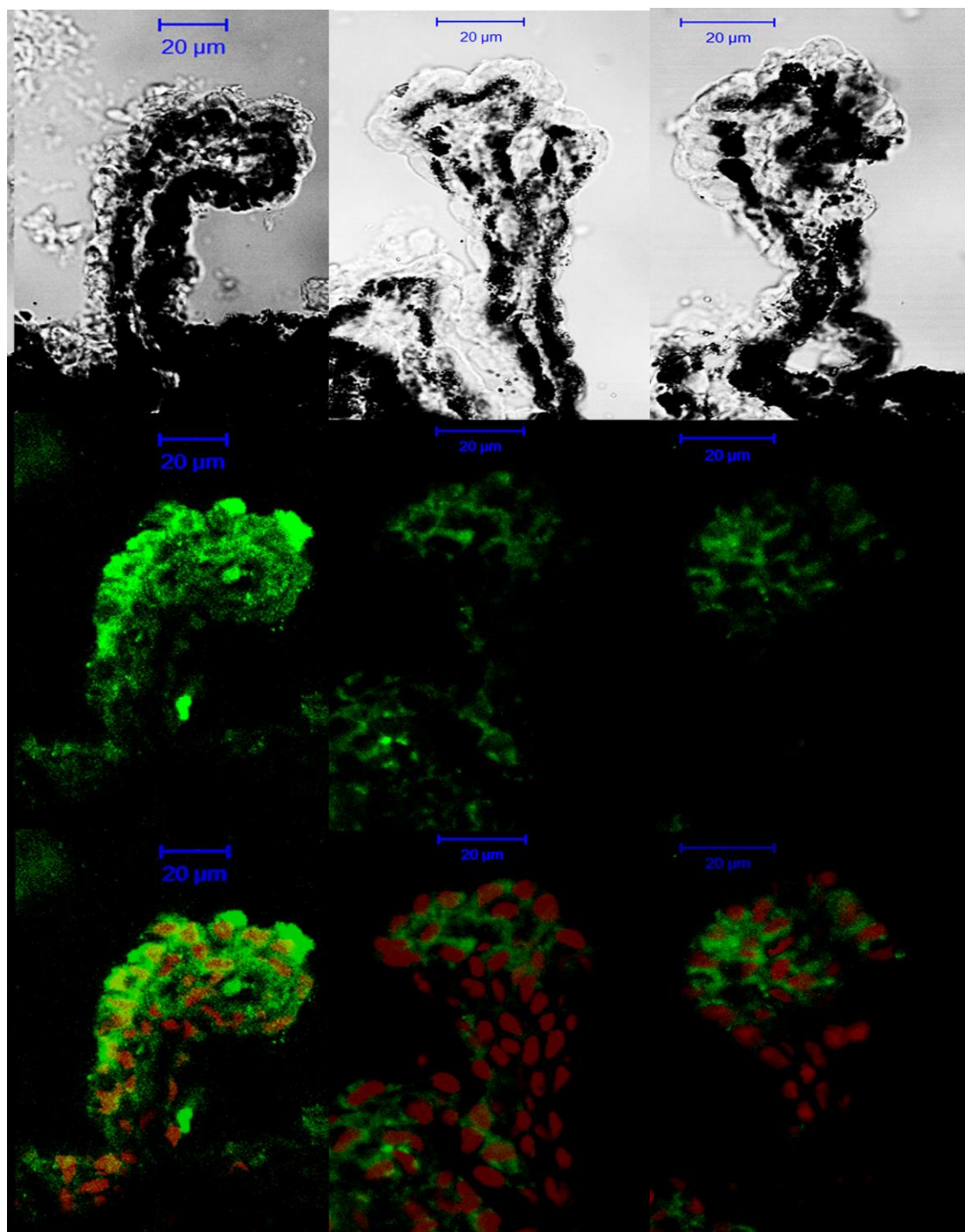


Figura 17. Imagen del gel resultante de la RT-PCR de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>.

El marcador de peso molecular M representa: 1 kb (10000-250 pb); El marcador de peso molecular m representa: 100 bp (1000-100 bp).

## 2.2 Inmunohistoquímica de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>.

En la siguiente figura se muestra la presencia y distribución de los tres receptores de estudio en el modelo de ratón glaucomatoso a los 3 meses de edad. Podemos observar diferente intensidad de fluorescencia para cada receptor. Observar esta expresión de proteína de los receptores de estudio en nuestro modelo animal junto con los resultados de la RT-PCR corroboraba la hipótesis planteada al principio del trabajo experimental y nos dio lugar a la continuación de la realización de los siguientes ensayos.



**Figura 18. Panel expresión DBA 3 meses**

Representación de la inmunohistofluorescencia de los procesos ciliares de los ratones DBA/2J de 3 meses. De arriba a abajo observamos el contraste de fase, la fluorescencia y los núcleos celulares marcados con ioduro de propidio. De izquierda a derecha están representados los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>.

### **Objetivo 3: Describir la implicación de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> con la evolución de la patología.**

Tras comprobar la presencia de los receptores de estudio del presente trabajo en los procesos ciliares del modelo glaucomatoso y control, iniciamos el seguimiento de los receptores a lo largo de la vida de los ratones, lo cual implicaba a su vez que el seguimiento se llevó a cabo en relación con la evolución de la patología. Los estadíos que elegimos para los experimentos fueron 3, 6, 9 y 12 meses. Tanto en los resultados de las PCR cuantitativas como los resultados de inmunohistoquímica están representados los cambios obtenidos entre los ratones DBA/2J y los ratones C67BL/6J y los cambios de ambos con respecto a la edad y evolución de la patología.

#### **3.1 EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS CON LA EVOLUCIÓN DE LA PATOLOGÍA**

Para el estudio de la expresión del ARN mensajero de los receptores purinérgicos se efectuó mediante la técnica de la PCR cuantitativa, descrita en el apartado de métodos 2.3.6. Los valores obtenidos fueron normalizados con la cantidad expresada del gen control GAPDH.

### 3.1.1 Receptor P2Y<sub>1</sub>

La expresión del receptor P2Y<sub>1</sub> permaneció invariable a lo largo de la vida de los ratones C57BL/6J o control. Cuando comparamos entre los ratones control y los DBA/2J, la expresión de este receptor fue dos veces mayor en los DBA/2J a los tres meses de edad ( $p=0.005$ ). Al realizar la comparación en relación con los meses de los ratones DBA/2J observamos que la expresión del P2Y<sub>1</sub> estaba más elevada a los 3 meses que a los 12 meses, lo que nos indica que hay una tendencia a la disminución de expresión con la edad (Figura 19).

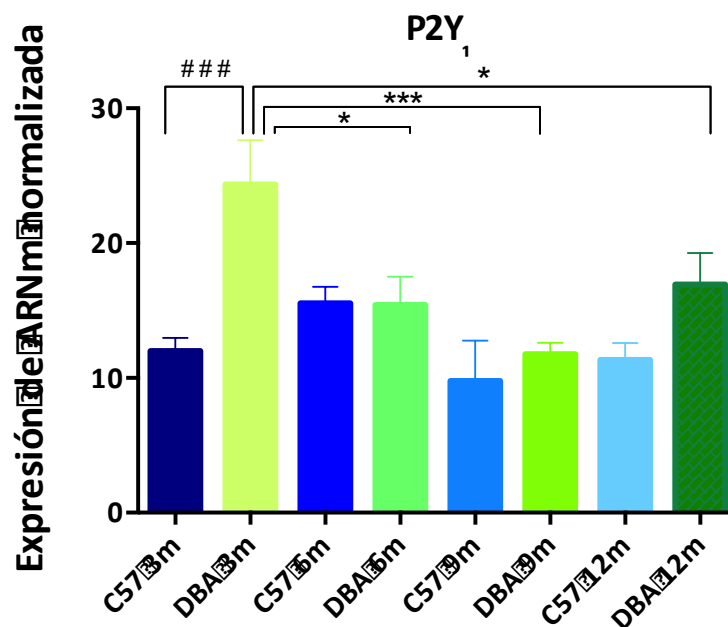


Figura 19. Representación de la evolución temporal de la expresión del receptor P2Y<sub>1</sub> en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J.

Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 43 animales de cada cepa. (\* $p<0.05$ , \*\*\*  $p<0.001$  comparación entre la misma cepa; ### $p<0.001$  comparación entre ambas cepas); ANOVA de una vía con el test de la comparación múltiple de Dunnett).

### 3.1.2 Receptor P2Y<sub>2</sub>

Con respecto a la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en los ratones control pudimos ver que esta también permanecía constante durante toda la vida de los animales. Sin embargo, aparecía un incremento de la expresión de este receptor dependiente de la evolución de la patología, llegando a estar incrementada la expresión 6 veces más en los ratones DBA/2J de 12 meses comparándolos con los de 3 meses ( $p=0.005$ ). Este incremento en la expresión se empieza a ver a los 6 meses de edad (Figura 20).

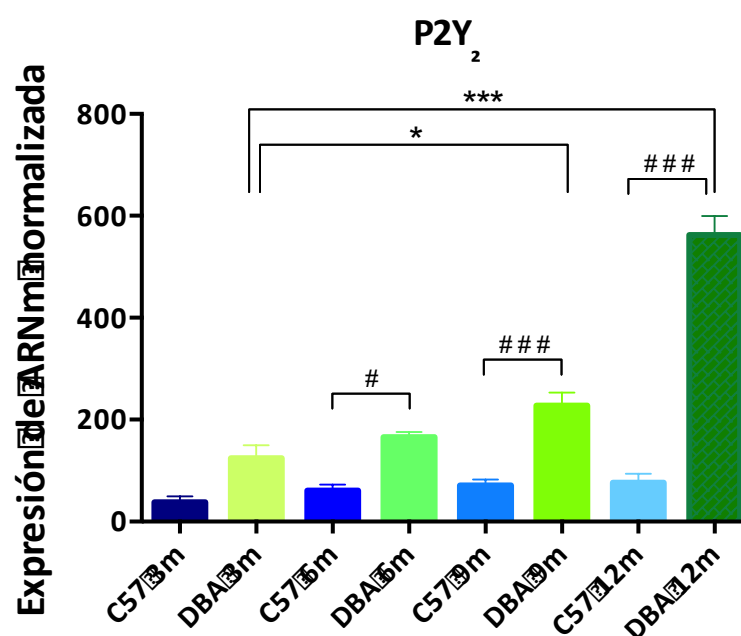


Figura 20. Representación de la evolución temporal de la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J.

Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 43 animales de cada cepa. (\* $p<0.05$ , \*\*\*  $p<0.001$  comparación entre la misma cepa; ### $p<0.001$  comparación entre ambas cepas); ANOVA de una vía con el test de la comparación múltiple de Dunnett).

### 3.1.3 Receptor P2Y<sub>6</sub>

Al igual que con los anteriores receptores, el patrón de expresión del P2Y<sub>6</sub> con respecto al tiempo en los ratones control permaneció constante con el tiempo. Podríamos decir que los resultados de los niveles de expresión de este receptor en los ratones glaucomatosos mostraron el mismo patrón que el receptor P2Y<sub>2</sub>, es decir, aparecía un incremento de la expresión con respecto a la edad y de la patología. Este aumento fue significativo a la edad de 3 meses y se vio como iba aumentando progresivamente hasta verse expresado 6 veces más a los 12 meses de edad si lo comparábamos con la expresión a los 3 meses ( $p=0.005$ ) (Figura 21).

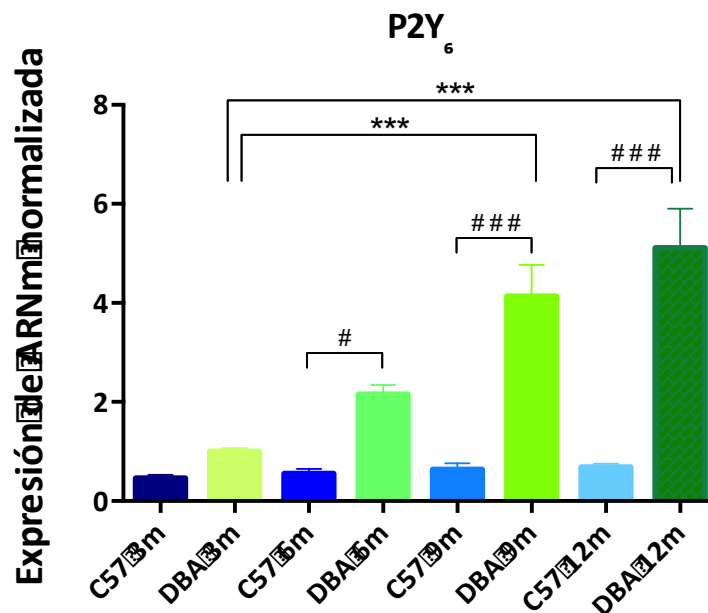


Figura 21. Representación de la evolución temporal de la expresión del receptor P2Y<sub>6</sub> en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J.

Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 43 animales de cada cepa. (\* $p<0.05$ , \*\*\*  $p<0.001$  comparación entre la misma cepa; ### $p<0.001$  comparación entre ambas cepas); ANOVA de una vía con el test de la comparación múltiple de Dunnett.

### **3.2 INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN DE LA PATOLOGÍA**

Mediante técnicas de inmunohistoquímica también pudimos comprobar la disminución o aumento de la expresión de los receptores P2Y con los meses en consonancia con los resultados obtenidos en las PCR cuantitativas.

Los paneles mostrados para cada receptor están distribuidos de la siguiente manera: imagen de los procesos ciliares de los C57BL/6J a los 3 meses de edad (columna izquierda), la de los DBA/2J a los 3 meses de edad (columna central) y los ratones DBA/2J a los 12 meses de edad (columna derecha). El anticuerpo contra los receptores aparece en color verde, y los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio, en rojo.



### 3.2.1 Inmunohistoquímica del receptor P2Y<sub>1</sub>

Las imágenes tanto del contraste de fase como las imágenes confocales nos muestran que el receptor P2Y<sub>1</sub> estaba distribuido principalmente en el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares y hay una diferencia notoria entre el estadio de 3 meses entre los ratones glaucomatosos y los controles. También encontramos que la expresión estaba elevada en los ratones DBA de 3 meses con respecto a los DBA de 12 meses. Al realizar una cuantificación relativa de la fluorescencia de los procesos ciliares de ambos ratones se puede observar como la intensidad de marcaje en el ratón DBA fue 2.2 veces superior a la del C57 ( $64.57 \pm 7.75$  % frente a  $143.10 \pm 13.46$  %, figura 22). Estos resultados coinciden con el cambio detectado en los estudios de PCR cuantitativa.

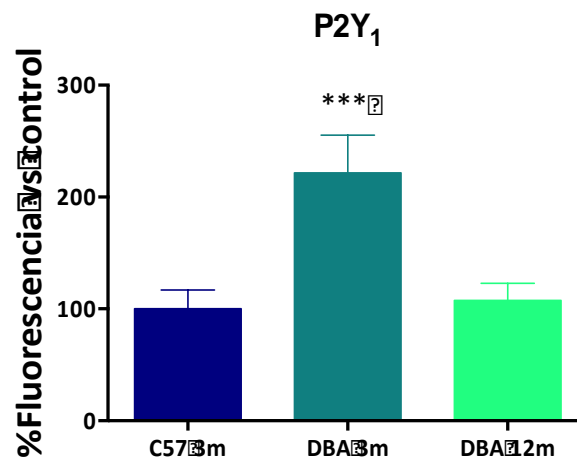
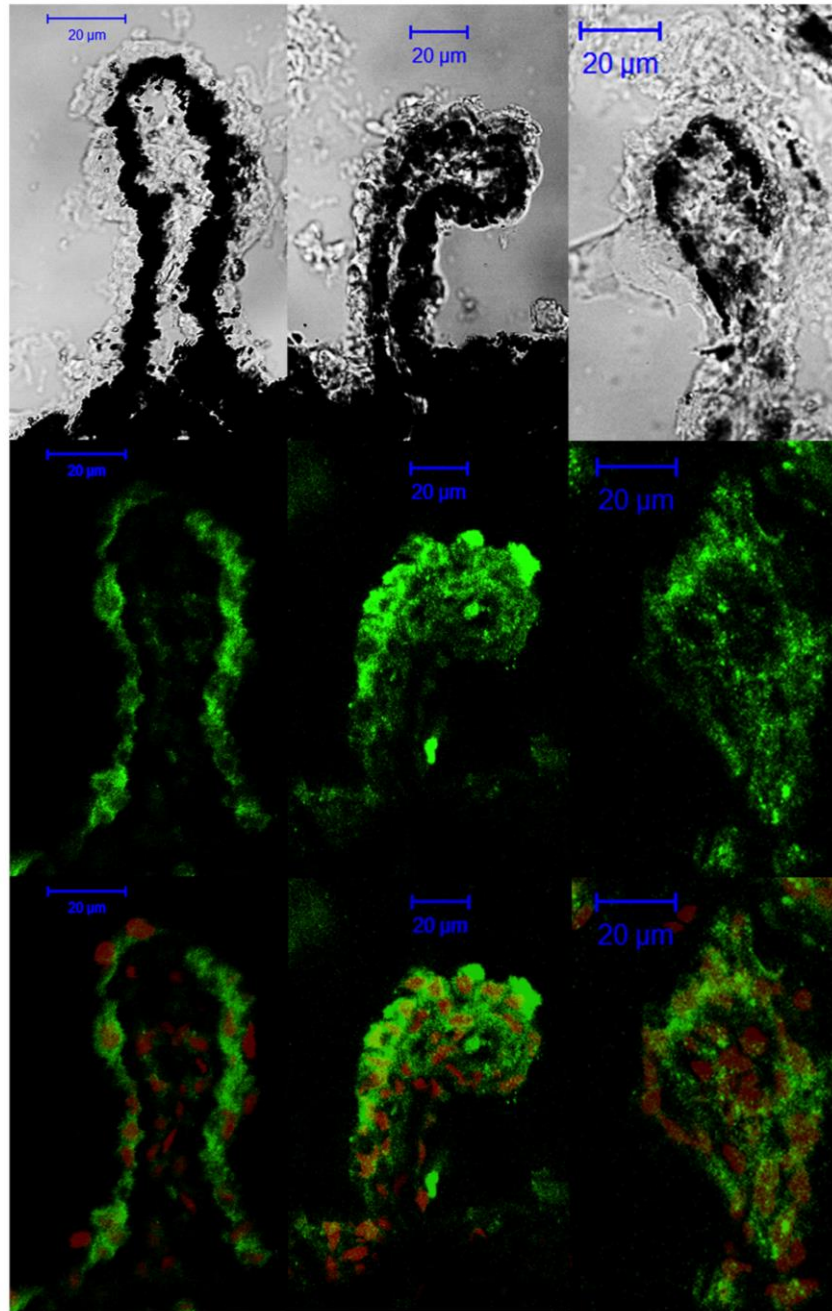


Figura 22. Cuantificación de la fluorescencia del receptor P2Y<sub>1</sub> en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.

\*\*\*  $p < 0.001$  respecto a los 3 meses del ratón control (C57). Test de ANOVA de una vía con post-test de Sidak.



**Figura 23.** Representación de la distribución celular del receptor  $P2Y_1$  en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J.

En la imagen se muestra la inmunohistofluorescencia de los procesos ciliares de C57BL/6J 3 meses (columna izquierda) frente al DBA/2J de 3 y 12 meses (columna central y columna derecha, respectivamente). La barra de escala son 20  $\mu\text{m}$ . En verde se muestra la fluorescencia de los anticuerpos frente al receptor  $P2Y_1$ . En rojo aparecen marcados los núcleos de las células.

### 3.4.2 Inmunohistoquímica del receptor P2Y<sub>2</sub>.

En estas imágenes, las de contraste de fase y las imágenes confocales, nos muestran que el receptor P2Y<sub>2</sub> también estaba distribuido especialmente en el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares. Su expresión se vio aumentada con la edad, y por tanto con la evolución de la patología en los ratones DBA/2J. Al realizar una cuantificación relativa de la fluorescencia de los procesos ciliares de ambos ratones se puede observar como la intensidad de marcaje en el ratón DBA fue 3.9 veces superior a la del C57 ( $37.01 \pm 0.88$  % frente a  $145 \pm 13.14$  %, figura 24). Estos resultados coinciden con el cambio detectado en los estudios de PCR cuantitativa.

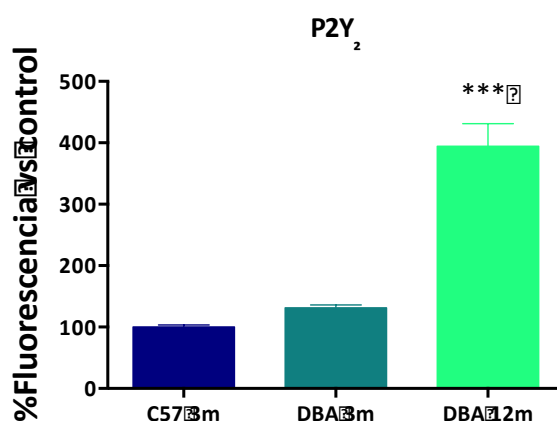
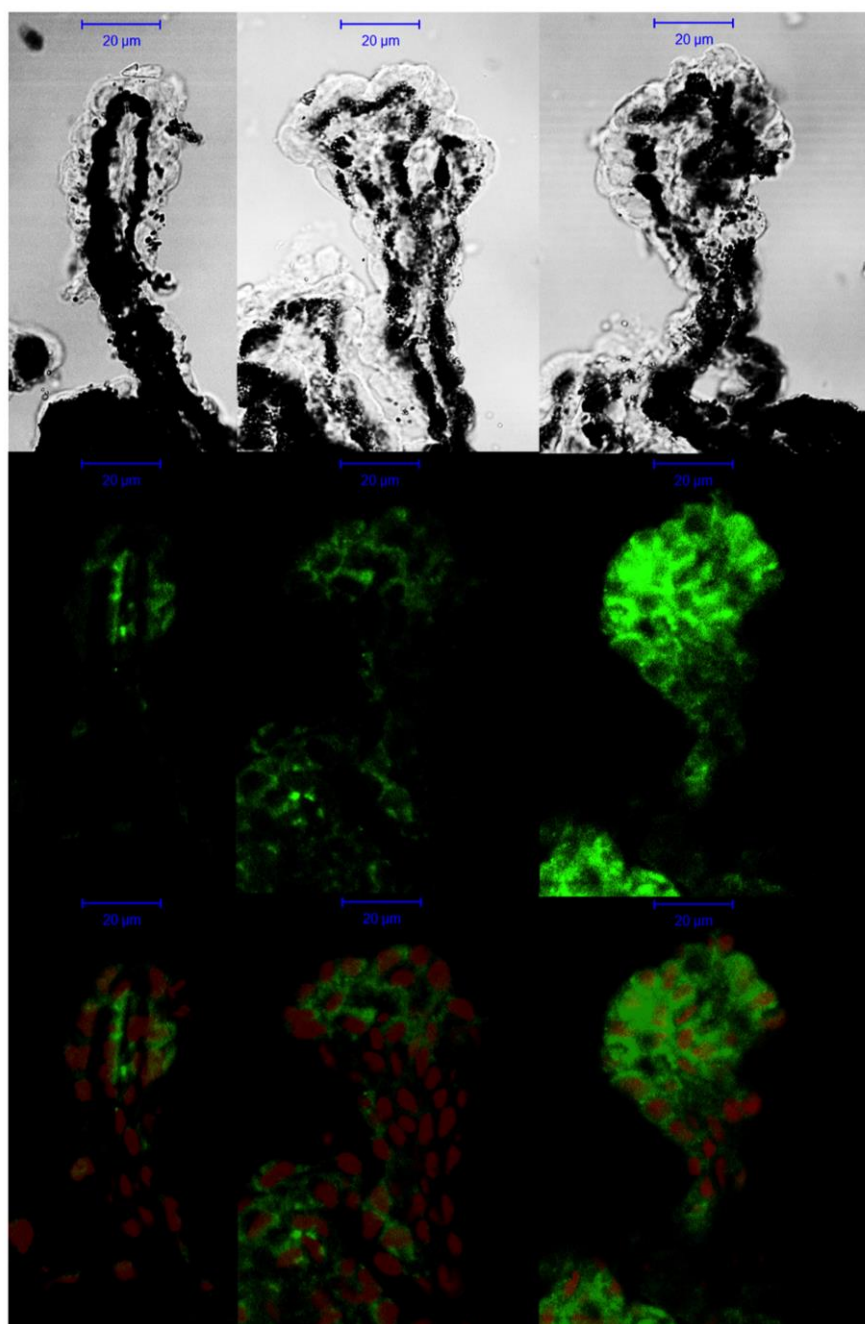


Figura 24. Cuantificación de la fluorescencia del receptor P2Y<sub>2</sub> en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.

\*\*\*  $p < 0.001$  respecto a los 3 meses del ratón control (C57). Test de ANOVA de una vía con post-test de Sidak.



**Figura 25.** Representación de la distribución celular del receptor  $P2Y_2$  en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J.

En la imagen se muestra la inmunohistofluorescencia de los procesos ciliares de C57BL/6J 3 meses (columna izquierda) frente al DBA/2J de 3 y 12 meses (columna central y columna derecha, respectivamente). La barra de escala son 20  $\mu\text{m}$ . En verde se muestra la fluorescencia de los anticuerpos frente al receptor  $P2Y_2$ . En rojo aparecen marcados los núcleos de las células.

### 3.4.3 Inmunohistoquímica del receptor P2Y<sub>6</sub>

Al igual que los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub>, el receptor P2Y<sub>6</sub> encontramos que aparecía localizado en el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares en ambas cepas. Vimos como su expresión incrementaba a los 12 meses de edad de los DBA/2J comparado con los animales de 3 meses y también cuando lo comparábamos con los animales control. Al realizar una cuantificación relativa de la fluorescencia de los procesos ciliares de ambos ratones se puede observar como la intensidad de marcaje en el ratón DBA fue 3.7 veces superior a la del C57 ( $50.29 \pm 3.19$  % frente a  $183.90 \pm 6.63$  %, figura 26). Estos resultados coinciden con el cambio detectado en los estudios de PCR cuantitativa.

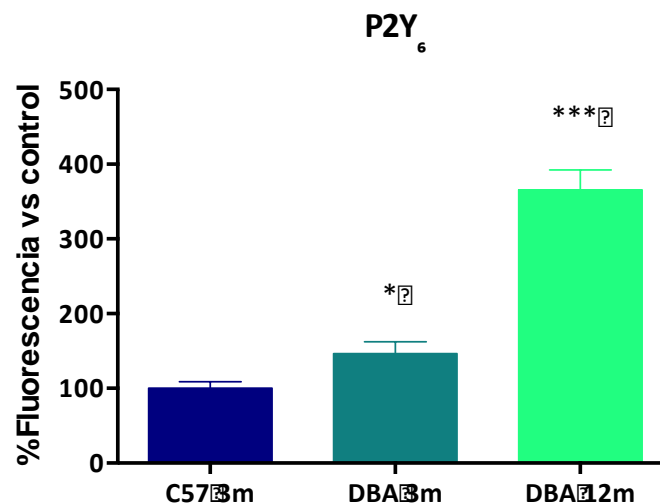
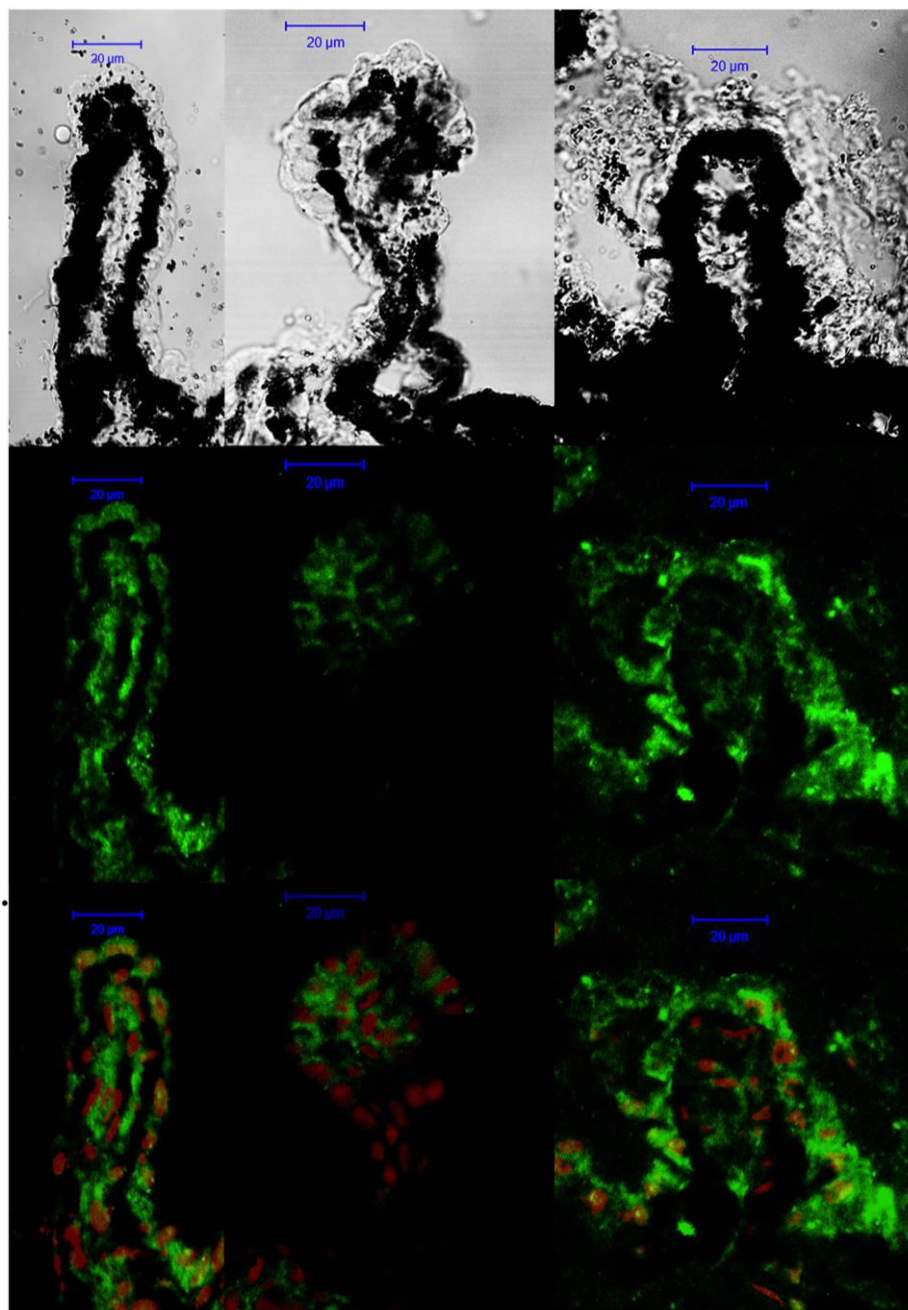


Figura 26. Cuantificación de la fluorescencia del receptor P2Y<sub>6</sub> en procesos ciliares del ratón C57BL/6J frente al DBA/2J.

\* $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  respecto a los 3 meses del ratón control (C57). Test de ANOVA de una vía con post-test de Sidak.



**Figura 27.** Representación de la distribución celular del receptor  $P2Y_6$  en los procesos ciliares de C57BL/6J frente a DBA/2J.

En la imagen se muestra la inmunohistofluorescencia de los procesos ciliares de C57BL/6J 3 meses (columna izquierda) frente al DBA/2J de 3 y 12 meses (columna central y columna derecha, respectivamente). La barra de escala son 20  $\mu\text{m}$ . En verde se muestra la fluorescencia de los anticuerpos frente al receptor  $P2Y_6$ . En rojo aparecen marcados los núcleos de las células.



## Objetivo 4: Comprobar el efecto del Ap<sub>4</sub>A como agente hipotensor

A la vista de los resultados anteriores donde pudimos demostrar la presencia de los receptores purinérgicos y conociendo el efecto que tiene el Ap<sub>4</sub>A sobre la PIO por los resultados obtenidos con anterioridad en el grupo de investigación, quisimos comprobar el efecto del Ap<sub>4</sub>A en nuestros animales, siguiendo el protocolo explicado en material y métodos en el apartado 2.1. Estos experimentos se llevaron a cabo en los ratones DBA/2J de entre los 9 y 12 meses de edad ya que era el periodo donde la patología ya estaba establecida, la PIO estaba elevada y se mantenía estable en estos animales. Las medidas se hicieron a su vez con los ratones control de la misma edad.

### 4.1 Dosis respuesta del Ap<sub>4</sub>A

Para determinar qué dosis era la más adecuada para poder observar el efecto que tenía el dinucleótido sobre la presión intraocular, instilamos el Ap<sub>4</sub>A a diferentes concentraciones en los ratones DBA/2J y en los C57BL/6J en un rango de concentraciones que empezaba en  $10^{-8}$  M e iba hasta  $10^{-3}$  M.

En la figura 28 se refleja el comportamiento sigmoideo del Ap<sub>4</sub>A, presentando un valor calculado del pD<sub>2</sub> de  $4.9 \pm 0.5$  en los ratones normotensos, y de  $5.1 \pm 0.4$  en los ratones glaucomatosos, lo cual era equivalente a un EC<sub>50</sub> de 9.0  $\mu$ M y de 8.9  $\mu$ M respectivamente. Además, pudimos observar que las concentraciones por encima de  $10^{-4}$  M no producían una mayor reducción en la PIO.

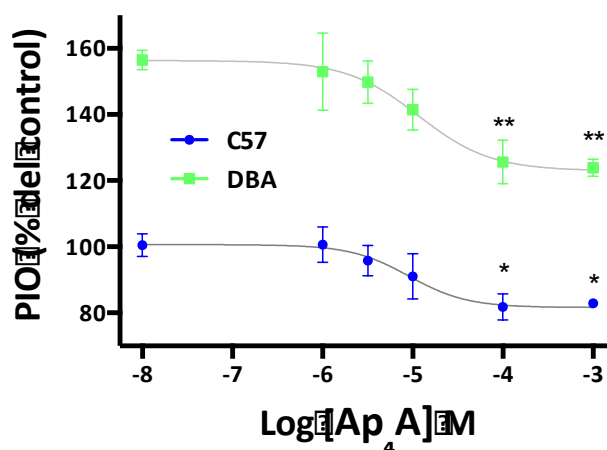


Figura 28. La gráfica muestra la curva de la dosis-respuesta del Ap<sub>4</sub>A sobre la presión intraocular.

Los datos representan el porcentaje de baja de PIO respecto de los valores basales del ratón DBA/2J (gráfica superior) y la del control C57BL/6J (gráfica inferior) (n=15, \*p<0.05 y \*\*p<0.01 frente a. control. Test de ANOVA de dos vías con el post-test de Tukey).

## 4.2 Estudio del efecto del dinucleótido Ap<sub>4</sub>A sobre la PIO con respecto al tiempo.

Una única dosis de 2  $\mu$ L de Ap<sub>4</sub>A 100  $\mu$ M instilado tópicamente fue capaz de producir una reducción de la presión intraocular medible durante varias horas. El efecto máximo de reducción se obtuvo a las 3 horas de la instilación, y se alcanzaban valores iniciales tras un periodo de 6 horas de la aplicación (Figura 29). La reducción de la presión intraocular fue del  $30.6 \pm 6.6$  % en los ratones glaucomatosos DBA/2J y del  $17.9 \pm 4.0$  % en los ratones C57BL/6J, cuando comparamos con los animales tratados con salina (control).

PIO	DBA/2J	C57BL/6J
PIO Basal	$23.4 \pm 1.5$	$14.7 \pm 1.1$
PIO 3h	$16.2 \pm 1.6$	$11.8 \pm 0.6$

Tabla 11. Valores de PIO en ambas cepas de ratón, con respecto al tiempo, expresados en mmHg



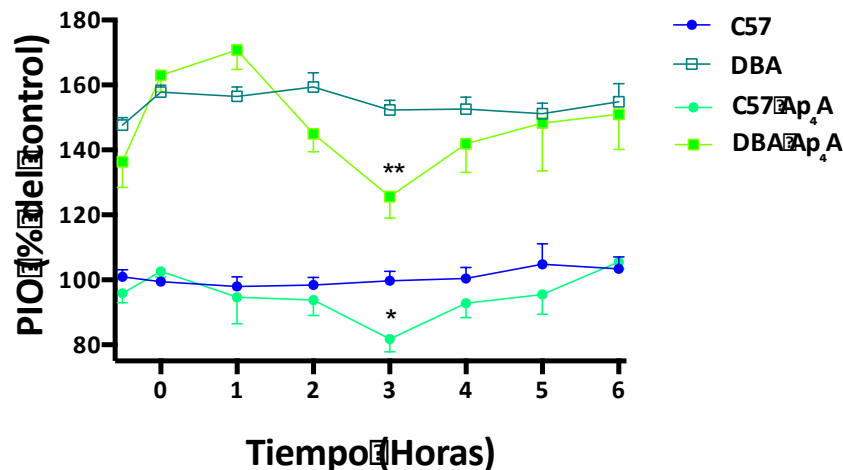


Figura 29. Representación del efecto del Ap<sub>4</sub>A (100 μM, 2 μL) a lo largo de 6 horas en ambos tipos de animales.

Se puede ver que tanto en el modelo glaucomatoso (gráficas superiores) como en el modelo normotenso o control (gráficas inferiores) se produce una bajada de PIO. (n=14. \*p<0.05 y \*\*p<0.01 frente a control. Test de ANOVA de dos vías con el post-test de Tukey.

#### 4.3 Estudio del efecto de los antagonistas de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>.

Como se ha mencionado anteriormente en la introducción, ha sido descrito previamente que el Ap<sub>4</sub>A es un agonista selectivo de P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> (von Kugelgen, 2006). Por ello decidimos probar el efecto del Ap<sub>4</sub>A sobre la presión intraocular en nuestro modelo de hipertensión en presencia de antagonistas purinérgicos P2Y, obteniendo una primera aproximación de la implicación que podían tener estos receptores purinérgicos en la patología del glaucoma, la elevación de la presión intraocular y su modulación con el Ap<sub>4</sub>A. Los animales fueron instilados media hora antes del Ap<sub>4</sub>A con una única dosis de 2 μl 100 μM de MRS2179 (antagonista selectivo del P2Y<sub>1</sub>), de MRS2578 (antagonista selectivo de P2Y<sub>6</sub>) y un cóctel de suramina, PPADS y RB-2 para antagonizar el receptor P2Y<sub>2</sub>.

Como se ha visto en el apartado anterior, el  $\text{Ap}_4\text{A}$  produjo un descenso de la PIO un  $30.6 \pm 6.6 \%$  en los ratones DBA/2J y un  $17.9 \pm 4.0 \%$  en los C57BL/6. Al realizar el tratamiento antagonista, se ha podido comprobar que el efecto hipotensor del  $\text{Ap}_4\text{A}$  en ambos animales se antagonizó de manera diferente en cada uno de ellos. Se produjo un antagonismo completo en presencia del MRS2179 y del cóctel de suramina, PPADS y RB2 en los ratones C57BL/6J (Figura 30), mientras que en los ratones DBA/2J este efecto hipotensor del  $\text{Ap}_4\text{A}$  fue inhibido completamente por el antagonista MRS2578 y por el cóctel de suramina, PPADS y RB-2. (Figura 31).

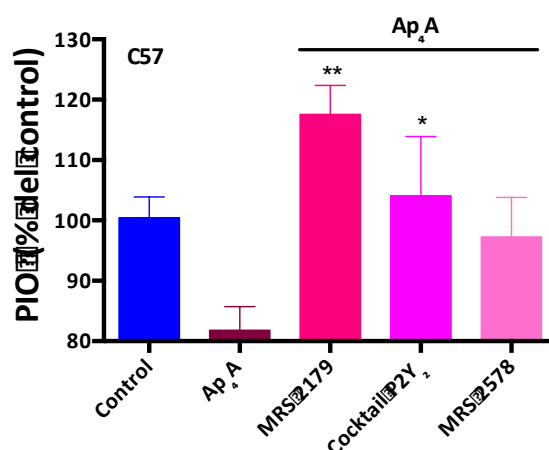


Figura 30. Efecto en los ratones C57BL/6J de los antagonistas selectivos de los receptores  $\text{P2Y}_1$ ,  $\text{P2Y}_2$  y  $\text{P2Y}_6$ .

N=15, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  frente a.  $\text{Ap}_4\text{A}$ . Test de ANOVA de una vía con las comparaciones múltiples del test de Dunnett).

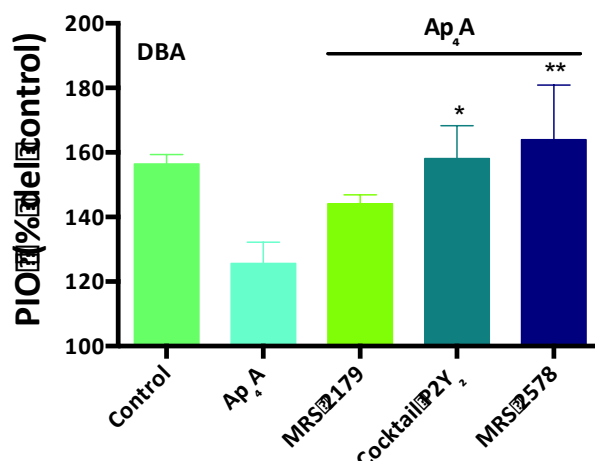


Figura 31. Efecto en los ratones DBA de los antagonistas selectivos de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>

N=15, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 frente a Ap<sub>4</sub>A. Test de ANOVA de una vía con las comparaciones múltiples del test de Dunnett).

Para ver con más detalle los cambios que se producen en la presión intraocular en función del antagonista instilado en presencia de Ap<sub>4</sub>A se muestran en las siguientes tablas los valores de PIO expresados en mmHg, tanto para los ratones control (C57) como para los ratones glaucomatosos (DBA).

PIO	MRS2179	Cóctel	MRS2578
PIO Basal	15.1 ± 1.6	17.1 ± 0.4	19.0 ± 0.8
PIO 3h	18.7 ± 0.5	17.2 ± 1.7	18.0 ± 1.7

Tabla 12. Variación de los valores de PIO en los ratones C57BL/6J expresados en mmHg.

PIO	MRS2179	Cóctel	MRS2578
PIO Basal	19.0 ± 2.7	18.0 ± 2.8	22.6 ± 2.9
PIO 3h	18.7 ± 0.8	19.5 ± 2.1	24.1 ± 2.9

Tabla 13. Variación de los valores de PIO en los ratones DBA/2J expresados en mmHg.

#### 4.4 Efecto a largo plazo de la instilación tópica del Ap<sub>4</sub>A

Sabiendo que el Ap<sub>4</sub>A era capaz de disminuir la PIO en los ratones glaucomatosos, quisimos saber que podía pasar si instilábamos Ap<sub>4</sub>A de manera constante durante el desarrollo de los ratones glaucomatosos. Para permitir un mejor entendimiento del proceso glaucomatoso que sucede en los ratones DBA/2J, este compuesto fue instilado tópicamente 3 veces por semana durante 3 meses consecutivos en el momento de mayor subida de la PIO en el modelo glaucomatoso (empezando en el sexto mes y terminando en el noveno) tanto en los animales glaucomatosos como en los animales controles o normotensos. Como se puede ver en la figura 32, existe una clara tendencia en aquellos animales glaucomatosos tratados con 2  $\mu$ L a una concentración 100  $\mu$ M de Ap<sub>4</sub>A de reducción en el incremento de la PIO comparado con aquellos animales glaucomatosos solo tratados con salina. Aunque esta tendencia fue visible desde el segundo mes del tratamiento (que correspondió a la octava semana de tratamiento), sólo fue posible ver diferencias estadísticamente significativas en las dos últimas semanas de tratamiento. En este punto, las diferencias de PIO fueron de aproximadamente un 19% de reducción, con un estancamiento del incremento de la presión intraocular, comparando los animales tratados a largo plazo con los animales a los que solo se les instiló salina (considerados como no tratados).

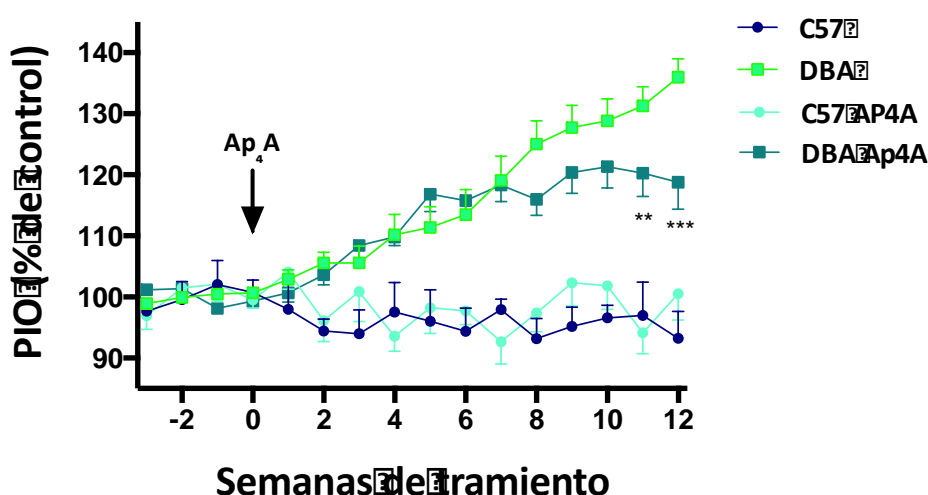


Figura 32. Evolución de la PIO desde el quinto al noveno mes de vida de los ratones DBA/2J y los ratones C56BL/6J.

Tratados con Ap<sub>4</sub>A. (n=20 \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 respecto a los tratados con solución salina). Test de ANOVA de dos vías con post-test de Tukey.

PIO	DBA	DBA+Ap <sub>4</sub> A	C57	C57+Ap <sub>4</sub> A
<b>5 meses</b>	9.0 ± 0.5	10.6 ± 0.5	13.2 ± 0.5	13.5 ± 0.4
<b>9 meses</b>	20.0 ± 0.8	16.5 ± 2.1	12.4 ± 1.0	12.7 ± 0.6

**Tabla 14. Valores de la variación de la PIO en los animales de experimentación con y sin tratamiento, expresados en mmHg**

La tabla 14 recoge los valores de presión intraocular basales y a los 9 meses de edad de los ratones control (C57) y los ratones glaucomatosos (DBA) tratados con Ap<sub>4</sub>A y con salina.

#### **4.4 Efecto de la instilación tópica del Ap<sub>4</sub>A combinado con fármacos comerciales**

Debido al efecto modulador de presión intraocular del Ap<sub>4</sub>A, quisimos saber qué ocurría si instilábamos los fármacos comerciales empleados en la reducción de la presión intraocular junto con el dinucleótido. Lo probamos tanto en los ratones DBA/2J como en los C57BL/6J combinando Ap<sub>4</sub>A con Timoftol® y con Alphagan®. Como se muestra en la figura 33, al instilar Ap<sub>4</sub>A con Timoftol® se producía una reducción de la PIO en ambas cepas de ratón, siendo esta reducción mayor en los ratones glaucomatosos (DBA/2J, gráficas superiores y C57 gráficas inferiores) llegando a disminuir un 54.8 ± 6.1 %.

Cuando observamos el comportamiento de la PIO al combinar Ap<sub>4</sub>A con Alphagan®, se vio el mismo comportamiento, aunque la reducción de la combinación de fármaco con el dinucleótido fue de un 42.5 ± 5.4 %, ligeramente menor que con el Timoftol® (Figura 34) (DBA/2J).

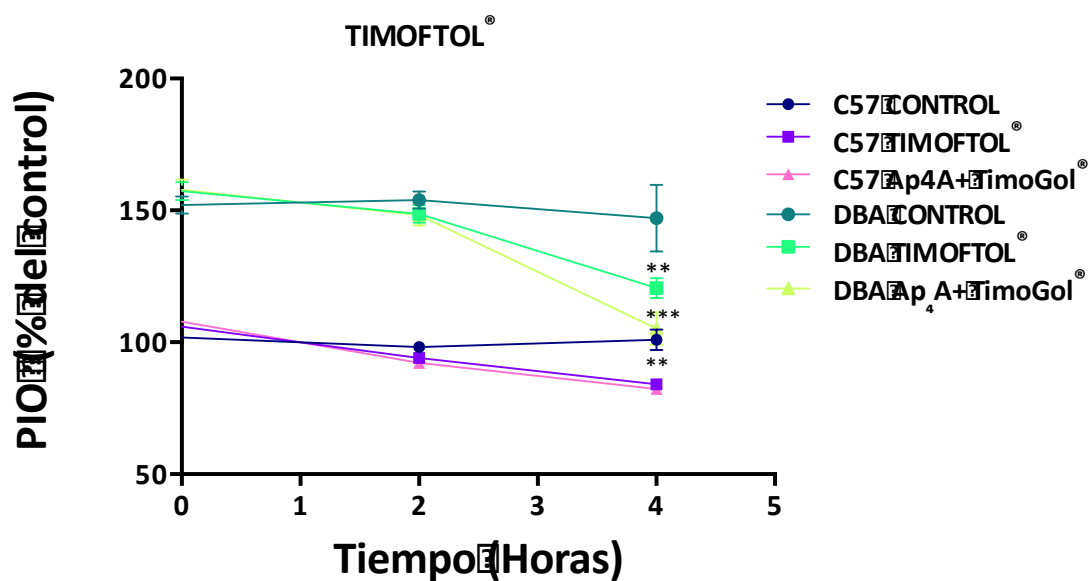


Figura 33. Representación de la PIO (% del control) al instilar Ap<sub>4</sub>A con Timoftol

Se muestran los resultados en ratones DBA/2J, parte superior, y en ratones C57BL/6J en la parte inferior de la gráfica. n=6. Test de ANOVA de una vía con post test de comparaciones múltiples de Sidak. pValor: \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001

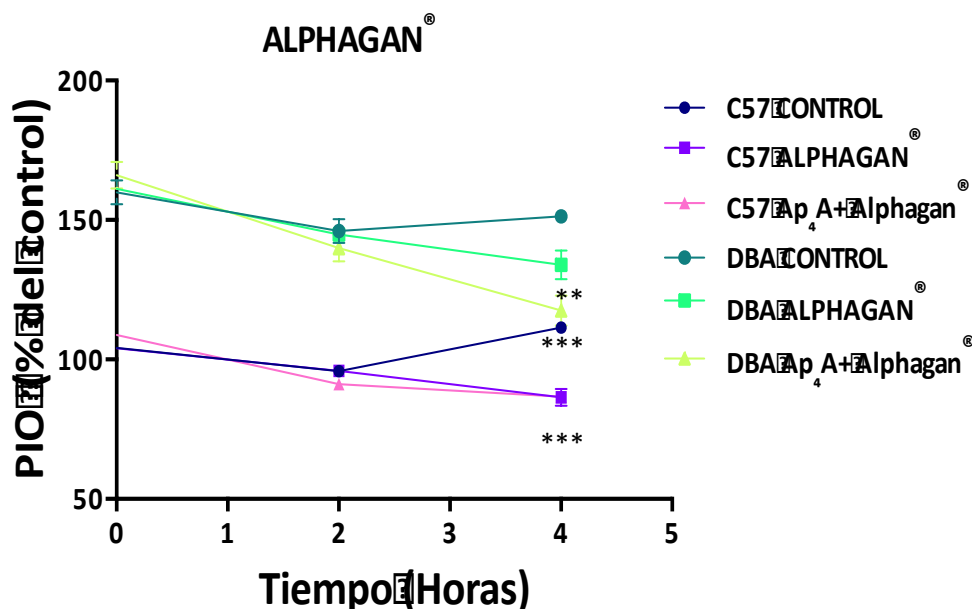


Figura 34. Representación de la PIO (% del control) al instilar Ap<sub>4</sub>A junto con Alphagan®

Se muestran los resultados en ratones DBA/2J, parte superior, y en ratones C57BL/6J en la parte inferior de la gráfica. n=6. Test de ANOVA de una vía con post test de comparaciones múltiples de Sidak. P Valor: \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001

La variación de la PIO en los ratones DBA/2J en presencia de los fármacos comerciales combinados con el  $\text{Ap}_4\text{A}$ , expresada en mmHg aparece en las siguientes tablas:

PIO	Salina	Alphagan®	$\text{AP}_4\text{A}$ +Alphagan®
<b>PIO Basal</b>	18.4 ± 0.5	17.7 ± 0.4	15.0 ± 0.8
<b>PIO 3h</b>	17.4 ± 0.4	14.7 ± 0.3	10.5 ± 0.4

Tabla 15. Variación de la PIO en los ratones DBA/2J cuando aplicamos Alphagan

PIO	Salina	Timoftol®	$\text{Ap}_4\text{A}$ +Timoftol®
<b>PIO Basal</b>	18.3 ± 0.3	21.2 ± 0.5	20.3 ± 0.9
<b>PIO 3h</b>	18.6 ± 0.8	16.2 ± 0.2	12.5 ± 0.8

Tabla 16. Variación de la PIO en los ratones DBA/2J cuando aplicamos tópicamente Timoftol

## Objetivo 5: Comprobar el efecto del $\text{Ap}_4\text{A}$ en células microgliales (BV-2) y en las células del EPR humano (ARPE-19).

Como se ha mencionado en la introducción, el glaucoma es considerado una patología neurodegenerativa (Quigley, 2011), caracterizada por una degeneración de distintos tipos celulares de la retina, en la que se ve afectada la calidad de la visión. Experimentos anteriores realizados en el grupo mostraron que el  $\text{Ap}_4\text{A}$  tenía un efecto neuroprotector a nivel de procesos ciliares (Hoyle and Pintor, 2010).

Tal y como se explica en material y métodos en el apartado 2.5.1, comprobamos los cambios producidos en ambas líneas celulares en presencia del  $\text{Ap}_4\text{A}$ .

### 5.1 EXPERIMENTOS EN CÉLULAS MICROGLIALES BV-2.

Para poder ver el efecto del  $\text{Ap}_4\text{A}$  en las células BV-2, empleamos la técnica de espectrofotometría de Fura-2 AM, donde pudimos ver la liberación al medio intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 5.1.1 Ensayo de Fura-2 AM de liberación de calcio al medio intracelular en presencia del $\text{Ap}_4\text{A}$ .

Cuando estimulábamos las células BV-2 con un rango de concentraciones de  $\text{Ap}_4\text{A}$  que iban desde 3  $\mu\text{M}$  a 3 mM, éstas mostraron un incremento de la fluorescencia dependiente de la dosis por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . La respuesta máxima del  $\text{Ap}_4\text{A}$  se obtuvo a una concentración de 3 mM ya que era la que presentaba una mayor fluorescencia entre los 30 y 90 segundos. Esta fluorescencia volvía a valores basales entre los 100 y los 300 segundos (Figura 35).

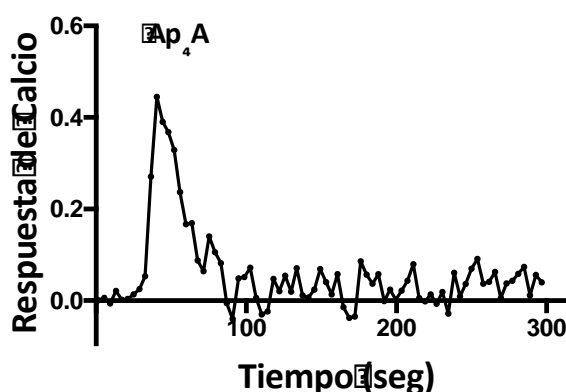
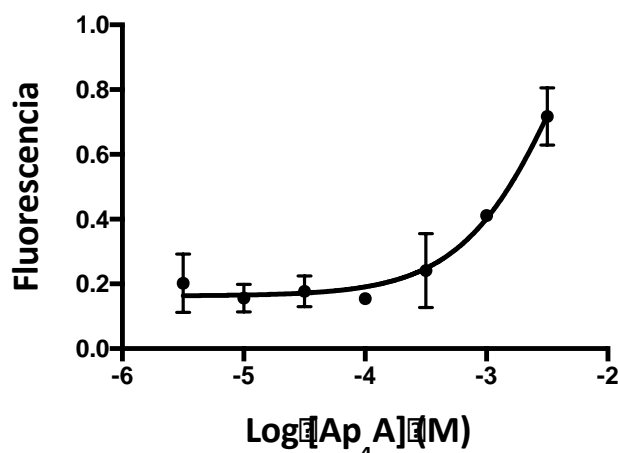


Figura 35. Fluorescencia obtenida en respuesta al  $\text{Ap}_4\text{A}$  3 mM durante un periodo de 0 a 300 segundos.

Como se puede ver en la figura anterior, y observando el comportamiento de la curva de la dosis respuesta (Figura 36) descartamos continuar temporalmente con experimentos en esta línea celular de la microglía para comprobar el posible efecto neuroprotector, ya que, por las características de la técnica de experimentación, la concentración requerida para obtener una respuesta considerable no era viable ( $\text{EC}_{50} = 5 \text{ mM}$ ).





**Figura 36.** Representación gráfica de la curva de la dosis respuesta del Ap<sub>4</sub>A en las células microgliales BV-2.

Los datos se representan como el nivel de cambio de la fluorescencia en función del logaritmo de la concentración. ( $EC_{50} = 5 \text{ mM}$ ;  $pD_2 = 2,29 \pm 0,34$ ) ( $n=3$ ).

## 5.2 EXPERIMENTOS EN CÉLULAS ARPE-19

Al igual que hicimos para las células BV-2, comprobamos la actividad de las células ARPE-19 en presencia de Ap<sub>4</sub>A. En esta línea celular también realizamos experimentos para ver como respondían las mismas en presencia de antagonistas selectivos para poder valorar a qué se debía cada una de las respuestas obtenidas en presencia tanto del Ap<sub>4</sub>A.

### 5.2.1 Dosis respuesta del Ap<sub>4</sub>A en las células ARPE-19

Siguiendo la misma metodología que en las células BV-2, realizamos experimentos de espectrofotometría Fura-2 AM, midiendo la liberación de  $Ca^{2+}$  al medio intracelular. Para ello, utilizamos un rango de concentraciones que iba de 1 nM a 1 mM y así pudimos determinar la concentración óptima para utilizar en el resto de los experimentos en función al  $EC_{50}$  obtenido.

La concentración a la cual se alcanzaba el valor para el Ap<sub>4</sub>A fue de 1.22  $\mu\text{M}$  que se correspondía con un  $pD_2$  de  $5.91 \pm 0.16$ . (Figura 37).

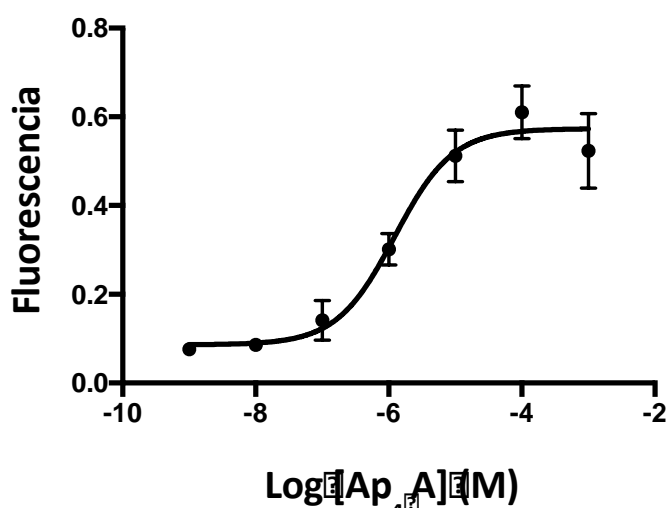


Figura 37. Representación gráfica de la dosis respuesta del Ap<sub>4</sub>A en las células ARPE-19.

Los datos se representan como el nivel de cambio de fluorescencia, en relación con el nivel de Ca<sup>2+</sup>, en función del logaritmo de la concentración.  $EC_{50}=1,22 \mu M$  ( $n=3$ ).

### 5.2.2 Experimentos de antagonistas de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> en las células ARPE-19

Para comprobar si los receptores de estudio de la tesis se activaban en las células del epitelio pigmentado de la retina (RPE) en presencia de Ap<sub>4</sub>A, fueron sometidas a tratamiento con el dinucleótido a una concentración final de 1 mM en presencia de los compuestos MRS2179, AR-C, MRS2578, que son antagonistas selectivos de P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> respectivamente, todos aplicados 30 minutos antes a una concentración final de 10  $\mu M$ .

Los resultados obtenidos nos mostraron que las células usadas como control negativo (buffer + buffer), es decir, las no tratadas con Ap<sub>4</sub>A, a las cuales sólo añadíamos el buffer de carga y los antagonistas la liberación de calcio al medio intracelular, mantienen la fluorescencia constante, así como aquellas tratadas con los antagonistas de los receptores purinérgicos de estudio. Sin embargo, aquellas células que fueron tratadas con Ap<sub>4</sub>A, experimentaron un incremento la liberación de Ca<sup>2+</sup> al medio intracelular en presencia del dinucleótido. En presencia del antagonista selectivo del receptor P2Y<sub>2</sub> esta fluorescencia aparecía

significativamente disminuida. A su vez, podemos observar como aquellas células tratadas con el antagonista selectivo del receptor  $P2Y_1$ , el MRS2179 en presencia de  $Ap_4A$ , experimentan un incremento de la liberación de calcio al medio intracelular mayor que las que fueron sólo tratadas con  $Ap_4A$ . Cuando se tomaron las medidas de fluorescencia para el antagonista selectivo del  $P2Y_6$  (MRS2579) no se observó ningún cambio. (Figura 38).

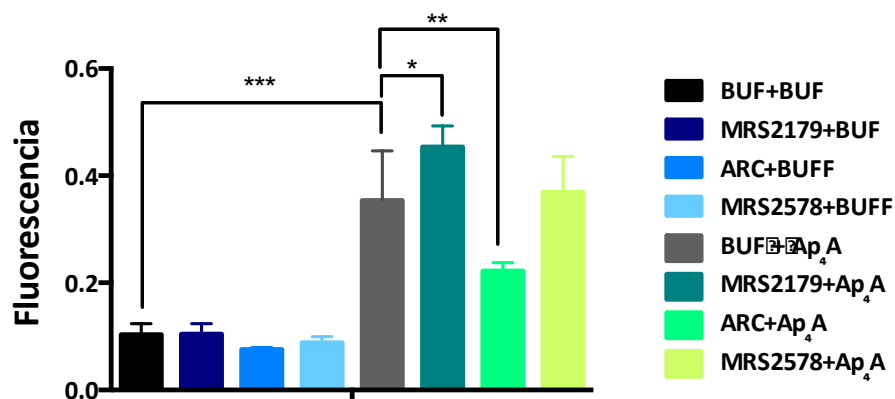


Figura 38. Efecto  $Ap_4A$  del en la liberación de Calcio al medio extracelular en presencia de antagonistas selectivos.

Test de ANOVA de una vía con el post test de Dunnet.  
 \*\*\*pvalor $\leq$ 0,0001; \*\*pvalor $\leq$  0,001; \*pvalor $\leq$ 0,05; (n=3).

## Discusión



## DISCUSIÓN

El principal objetivo del presente trabajo ha sido establecer una relación entre el ratón glaucomatoso DBA/2J y el dinucleótido  $Ap_4A$ . Sabemos que el  $Ap_4A$  está presente de forma natural tanto en humor acuoso como en procesos ciliares (Pintor et al., 2003), no sólo en modelos animales sino que también está presente en el ser humano. Además, los valores de este dinucleótido aparecen elevados en el humor acuoso de pacientes glaucomatosos llegando a tener 15 veces más que los pacientes sanos.(Castany et al., 2011).

El glaucoma está considerado como la principal causa de ceguera irreversible en el mundo, además es una patología multifactorial y neurodegenerativa que cursa generalmente con una presión intraocular elevada que a su vez produce un descenso en el número de células de la retina, provocando una pérdida de la visión progresiva (Burgoyne et al., 2005). Es por ello que el tratamiento más empleado para frenar la pérdida de la visión sea mediante el control de la PIO. Como norma general la administración de fármacos para disminuir la PIO en pacientes ayuda a retrasar o incluso a frenar el avance del glaucoma (Kass et al., 2002). Esto refuerza nuestra idea de que la administración de una molécula natural como lo es el  $Ap_4A$  para bajar la presión intraocular sería beneficioso para los pacientes que tienen glaucoma, ya que además de conseguir bajar la presión intraocular no tiene efectos secundarios como los fármacos comerciales actualmente existentes.

Conocemos, por estudios previos, la relación entre el sistema purinérgico, la presión intraocular y el glaucoma (Pintor et al., 2004b). Con este trabajo hemos podido caracterizar la evolución del glaucoma en los ratones DBA/2J y establecer una relación de los cambios observados en la patología en base a los receptores purinérgicos de estudio ( $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  y  $P2Y_6$ ). Mediante los ensayos llevados a cabo en células microgliales y del epitelio pigmentario de la retina hemos obtenido una primera aproximación a la interacción del  $Ap_4A$  con las células de la retina, haciendo interesante la continuación de su estudio para corroborar un efecto del

dinucleótido Ap<sub>4</sub>A como agente neuroprotector o regulador de los procesos de la retina.

Durante el desarrollo de la tesis, hemos podido comprobar que el modelo murino de glaucoma con el que hemos trabajado puede ser útil para trasladar los resultados obtenidos en los experimentos realizados al glaucoma padecido por el ser humano.

## ***1. PROGRESIÓN DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR EN LOS ANIMALES GLAUCOMATOSOS DBA/2J***

Los ratones comparten con el ser humano características anatómicas y de desarrollo del polo anterior del ojo, especialmente en las estructuras relacionadas con el flujo de humor acuoso (Daimon et al., 1997). Todos los avances en las medidas de la PIO en ojos pequeños han hecho que la investigación del glaucoma gire en torno principalmente a los modelos murinos (Goldblum et al., 2002, Reitsamer et al., 2004). Es más, la investigación enfocada en hipertensión y glaucoma, llevada a cabo en ratones en lugar de en otros modelos animales, está consiguiendo resultados con una información muy valiosa en lo que a extrapolar los resultados al ser humano se refiere. Un modelo murino interesante es el del ratón DBA/2J, el cual es un modelo glaucomatoso que sufre un aumento de la presión intraocular relacionado con la edad, marcando la evolución de la patología (Saleh et al., 2007, Perez de Lara et al., 2014).

Al medir la presión intraocular del ratón glaucomatoso comprobamos como se produce una subida de la misma que llega a alcanzar un 57% con respecto a los valores basales. Dicha subida comienza en torno a los 6 meses de edad del animal y se mantiene elevada hasta los 12-15 meses. Los resultados obtenidos en este trabajo experimental concuerdan con aquellos encontrados en la literatura que describen este modelo animal (Harazny et al., 2009).

Este modelo resulta bastante atractivo ya que permite probar compuestos con propiedades hipotensoras, no sólo en medidas puntuales sino proporcionando información de su efecto a largo plazo.

## ***2. PRESENCIA DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> Y P2Y<sub>6</sub> EN LOS PROCESOS CILIARES DEL MODELO ANIMAL GLAUCOMATOSO DBA/2J***

La presencia en la cámara anterior del ojo (procesos ciliares y malla trabecular) de los receptores purinérgicos de estudio ha sido demostrada con anterioridad en diferentes especies animales tales como la vaca, el mono, la rata conejo, el cerdo e incluso en humano (Pintor et al., 2004b, Shahidullah and Wilson, 1997, Cowlen et al., 2003, Crosson et al., 2004, Soto et al., 2005, Martin-Gil et al., 2012). Debido a que nuestro animal de estudio es un modelo murino, era importante conocer si estos receptores también se encontraban presentes en las estructuras de la cámara anterior del ojo. Hemos podido comprobar la presencia de los receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> en el modelo glaucomatoso DBA/2J y el C57BL/6J, lo que confirma la implicación de estos receptores en la modulación de la PIO como se había descrito con anterioridad en otros modelos animales. Dicha presencia en los procesos ciliares tanto de los ratones control como de los ratones glaucomatosos, se ha verificado mediante PCR e inmunohistoquímica. Con ello no sólo se ha comprobado la localización exacta en nuestro modelo de experimentación, si no la variación que experimentan con el avance de la patología en el modelo glaucomatoso. Además, esta información nos ha servido para poder llevar a cabo el resto de los objetivos en relación al Ap<sub>4</sub>A y este modelo murino de glaucoma.



### ***3. IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> Y P2Y<sub>6</sub> CON LA EVOLUCIÓN DE LA PATOLOGÍA.***

Como ya se ha mencionado anteriormente en la memoria, los receptores purinérgicos P2Y se encuentran distribuidos a lo largo de las diferentes estructuras del ojo humano (Guzman-Aranguez et al., 2013). La importancia de estos receptores en el glaucoma, se debe a que su presencia a nivel de cámara anterior, tanto en el cuerpo ciliar como en la malla trabecular, se ha vinculado con un importante papel en el drenaje del humor acuoso (Pintor et al., 2004c, Soto et al., 2005) y en la producción de humor acuoso (Martin-Gil et al., 2012).

A la vista de los resultados obtenidos tanto de la PCR cuantitativa como de la inmunohistoquímica acerca de los receptores purinérgicos, podemos decir que la expresión de estos receptores permanece prácticamente invariable a lo largo de la vida del ratón C57BL/6J, utilizado como control. Sin embargo, no ocurre lo mismo para los ratones DBA/2J, donde sí se observaron cambios de la expresión de los mismos con la edad y evolución de la patología.

En los animales glaucomatosos la expresión del ARN mensajero y de la proteína del receptor P2Y<sub>1</sub> está disminuida en estadios avanzados. Sin embargo, la expresión de mensajero y de proteína va aumentando progresivamente tanto en P2Y<sub>2</sub> como P2Y<sub>6</sub>, a medida que los animales aumentan su edad. Lo cual se correlaciona directamente con los hallazgos encontrados anteriormente en nuestro equipo de investigación al analizar los electroretinogramas de estos animales y la pérdida gradual de las células ganglionares de la retina con la edad (Perez de Lara et al., 2014). Estos cambios en polo anterior también se corresponden con otros vistos a nivel de polo posterior en los ratones DBA/2J de 12 meses, donde la patología ya está presente tales como que la liberación de ATP o la expresión del transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) están por encima de lo normal (Perez de Lara and Pintor, 2015). En conjunto, cada uno de estos hallazgos nos sugieren que los cambios que se observan a nivel de los receptores purinérgicos en

el ratón DBA/2J están relacionados con el desarrollo de la patología y no con el envejecimiento del animal.

La variación en la expresión de los receptores purinérgicos en los ratones glaucomatosos puede ser debida al deterioro que sufren los procesos ciliares con la edad ya que el glaucoma que padecen es de tipo exfoliativo, en el cual se produce una elevación de la PIO al encontrarse taponada la malla trabecular lo que dificulta el drenaje del humor acuoso. En base a esto, es posible que la reducción en la expresión del P2Y<sub>1</sub> y el aumento de la expresión de P2Y<sub>2</sub> produzcan parte de la elevación de la presión intraocular. El P2Y<sub>6</sub> podría estar sobreexpresado debido a que naturalmente está implicado en el proceso de vasoconstricción, lo que se traduce en una reducción en la producción del humor acuoso y por tanto en una reducción de la PIO (Markovskaya et al., 2008) intentando compensar la reducción del P2Y<sub>1</sub> y el aumento del P2Y<sub>2</sub>, que se encargarían de modificar el drenaje del mismo. Estas variaciones podrían explicar si el nivel elevado del Ap<sub>4</sub>A encontrado en el humor acuoso de pacientes con glaucoma podría ser el causante de la elevación de la PIO, ya que la cantidad de dinucleótido encontrada en humano es cercana a 300 nM, lo que permite estimular el receptor P2Y<sub>2</sub> pero no el P2Y<sub>6</sub> el cual requiere concentraciones del orden de micromolar para poder ser activado (Guzman-Aranguez et al., 2007).

#### ***4. EFECTO DEL Ap<sub>4</sub>A COMO AGENTE HIPOTENSOR EN UN MODELO DE GLAUCOMA***

El ratón DBA/2J se ha estudiado ampliamente como modelo de glaucoma, y los ratones tienen un sistema de producción y drenaje del humor acuoso muy parecido al del ser humano (Daimon et al., 1997). Debido a la implicación de los receptores en la modulación de la PIO que hemos explicado con anterioridad, fue interesante encontrar la presencia de los receptores purinérgicos de estudio tanto en los ratones control como en los ratones glaucomatosos, medido mediante PCR e inmunohistoquímica respectivamente. Esto nos daba la base para poder llevar a cabo el resto de los objetivos con relación al Ap<sub>4</sub>A y el glaucoma.

El efecto del  $Ap_4A$  en la PIO se comprobó a la edad de 9 meses, momento en el que la patología estaba presente en nuestros animales, según los estudios de PIO preliminares. Sobre los ratones normotensos tiene un efecto hipotensor, disminuyendo en torno a un 18%. Estudios previos del laboratorio ya habían demostrado este efecto en conejos normotensos obteniendo una respuesta similar de reducción de la PIO (Pintor et al., 2004b). Sin embargo, al estudiar el efecto en ratones con glaucoma o hipertensión se consigue una reducción mayor, llegando a disminuir la IOP aproximadamente un 31%.

Una vez confirmada la presencia de los receptores  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  y  $P2Y_6$  en los procesos ciliares, nuestro siguiente objetivo era observar el efecto del  $Ap_4A$  en presencia de antagonistas y confirmar la implicación de estos receptores, para los cuales el  $Ap_4A$  es agonista. Al realizar dicho antagonismo, obtuvimos un comportamiento diferente entre los ratones control y los ratones glaucomatosos. En los ratones control, el efecto del antagonista MRS2578, específico del receptor  $P2Y_6$  no tuvo efecto, pero se obtuvo un efecto significativo al antagonizar los receptores  $P2Y_1$  y  $P2Y_2$ . Sin embargo, en los ratones glaucomatosos solo se veía efecto de los antagonistas para  $P2Y_2$  y  $P2Y_6$ . Esta diferencia entre cepas nos hace suponer que la variación en la expresión de los receptores purinérgicos puede influir en los antagonismos, así como su variación durante la evolución de la patología.

En la literatura hemos encontrado que otros autores han comprobado el efecto de fármacos comerciales en los ratones DBA/2J y en los C57BL/6J, como la Dorzolamida, obteniendo una reducción de hasta un 60% de la PIO (Chandra et al., 2016). Esta diferencia con respecto a los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral, puede ser debida a que la dorzolamida actúa directamente sobre las anhidrasas carbónicas y el  $Ap_4A$  actúa sobre varios receptores como  $P2Y_1$  y  $P2Y_6$  que reducen la PIO en presencia del  $Ap_4A$ , pero también actúa sobre el receptor  $P2Y_2$ , el cual al ser activado por este dinucleótido, produce una subida en la presión intraocular (Martin-Gil et al., 2012). Ha sido demostrado que otros compuestos comerciales como la brimonidina y el

travoprost también son capaces de producir una reducción en la PIO en nuestro modelo animal y que por el contrario el beta-bloqueante Timolol no causaba ningún efecto cuando era instilado (Sawada et al., 2016).

Según el estudio de antagonistas llevado a cabo para intentar determinar qué receptores estaban involucrados en la disminución de la PIO cuando instilábamos  $Ap_4A$ , podemos decir que el efecto hipotensor en los ratones C57BL/6J se debe a la interacción del  $Ap_4A$  con el receptor  $P2Y_1$  (por el efecto observado al instilar el antagonista MRS2179). Este efecto ya había sido previamente descrito en otros modelos animales, normotensos, y se ha relacionado con la presencia de este receptor en la malla trabecular (Soto et al., 2004, Soto et al., 2005). Al observar el efecto hipotensor en los animales DBA/2J en presencia del dinucleótido y sus antagonistas, determinamos que esta bajada de PIO podría ser debida a la respuesta producida por el receptor  $P2Y_6$  (debido al efecto producido en presencia del antagonista MRS 2578).

Aunque no debemos descartar que otros receptores purinérgicos  $P2X$  estén involucrados en este efecto hipotensor, como el  $P2X_2$  (debido al efecto de la suramina y el PPADS), el hecho de encontrar estas diferencias de activación de receptores entre especies puede estar explicado por el deterioro que sufre la malla trabecular y el acumulo de pigmento que se produce en el animal glaucomatoso.

Además, tenemos que tener en cuenta que el dinucleótido  $Ap_4A$  es un agonista del receptor  $P2Y_2$ , el cual se encuentra en los procesos ciliares del ojo y se encarga de la síntesis del humor acuoso. Por tanto su activación nos daría un aumento en la presión intraocular.

Es por esto que podemos decir que cuando instilamos tópicamente el  $Ap_4A$  en los ratones y observamos un efecto hipotensor, se produce por un balance entre los diferentes receptores activados.

Conocemos de antemano, mediante nuestros experimentos, que la expresión de los receptores de estudio permanece constante a lo largo de la vida

del animal normotenso C57/6J, no siendo así en los ratones DBA/2J, donde P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> aumentan con la edad y P2Y<sub>1</sub> disminuye levemente. Sabiendo esto, podemos establecer una relación con los cambios en los niveles de expresión de ARN mensajero o de expresión de proteína obtenidos previamente, donde en el ratón DBA/2J disminuye la expresión de P2Y<sub>1</sub> con el avance de la patología, presumiblemente por el deterioro que se produce a nivel de malla trabecular en estos animales y esto a su vez podría ser uno de los desencadenantes del incremento de la presión intraocular con el paso del tiempo; los niveles de expresión de los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> se ve incrementada con el paso del tiempo. La reducción de la PIO causada por la posible activación del receptor P2Y<sub>6</sub> en procesos ciliares nos indica que el uso del Ap<sub>4</sub>A sería beneficioso para este modelo de hipertensión ocular.

Como se puede ver en los resultados, la presión intraocular de los ratones glaucomatosos tratados con Ap<sub>4</sub>A durante la evolución de la patología se mantenía por debajo de los valores de PIO que se midieron de los ratones glaucomatosos tratados con solución salina. La monitorización de la presión intraocular es considerada, junto con la evaluación del estado del fondo de ojo del paciente, como la prueba más importante y determinante para el manejo del glaucoma (McMonnies, 2015). Monitorizar el efecto a largo plazo de la administración de Ap<sub>4</sub>A nos ha permitido hacer una simulación de lo que sería un tratamiento de un paciente glaucomatoso, como ya se ha podido hacer con otros fármacos, donde se veía un gran control sobre el avance de la patología, parando los efectos causados por la misma (Bhowmik, 2012).

Por último, comprobamos el efecto que podía tener el Ap<sub>4</sub>A pre-instilado 2 horas antes de los fármacos comerciales. Estos resultados preliminares nos mostraron como el Ap<sub>4</sub>A en combinación con Timofтол® y con Alphagan® hacía que se viera incrementado el efecto hipotensor de estos fármacos comerciales cerca de un 55% y un 43% respectivamente. Estos resultados nos llevan a pensar de nuevo en el uso de Ap<sub>4</sub>A no sólo como agente hipotensor sino como agente potenciador en fármacos ya empleados en la reducción de la PIO como tratamiento para el

glaucoma. Ha sido demostrado que la pre-instilación del  $Ap_4A$  aumentaba el efecto hipotensor de los fármacos en animales normotensos debido a su actuación sobre las *tight-junctions* de la córnea, permeabilizándola y dejando pasar mayor concentración de los mismos a la cámara anterior (Loma et al., 2015). Por este motivo, harían falta más estudios en profundidad para ver el efecto real y total del  $Ap_4A$  en combinación con otros compuestos, y discernir si el efecto obtenido es debido al efecto hipotensor del  $Ap_4A$  o a una sinergia con su función permeabilizadora de la córnea.

Todos estos experimentos realizados para el control de la PIO mediante el dinucleótido  $Ap_4A$  en un modelo de hipertensión ocular, llevan a la idea de que esta molécula puede ser interesante a tener en cuenta para el tratamiento y control de la PIO en el glaucoma, siempre recordando que el tipo de glaucoma del ratón DBA/2J es de tipo pseudoexfoliativo, el cual llegado a un punto avanzado de la patología, impide el total control de los mecanismos de drenaje del humor acuoso a través de los receptores purinérgicos.

## **5. EFECTO DEL $Ap_4A$ EN CÉLULAS MICROGLIALES: BV-2 Y EN LAS CÉLULAS DEL EPR HUMANO: ARPE-19.**

Para establecer el último objetivo, que fue hacer una primera aproximación para comprobar si el  $Ap_4A$  podía tener un efecto neuroprotector a la vez que hipotensor, tuvimos en cuenta varios factores: Por un lado, el efecto protector del  $Ap_4A$  en el ojo basado en los estudios realizados en nuestro laboratorio en procesos ciliares de ratón (Hoyle and Pintor, 2010). Por otro, los experimentos llevados a cabo en microglía y diferentes células de la retina por el grupo de Julie Sanderson de la Universidad de East Anglia, acerca de los nucleótidos y los receptores P2 (Sanderson et al., 2014). Finalmente, tuvimos en cuenta la implicación de la señalización del sistema purinérgico en los procesos inflamatorios (Eltzschig et al., 2012).

Recientemente se ha estudiado acerca de la relación de la microglía y los receptores purinérgicos, y se ha llegado a la conclusión de que la elevada presión intraocular que se produce en el glaucoma es capaz de alterar el sistema purinérgico de las células de la microglía (Rodrigues-Neves et al., 2018). La activación de la microglía está mediada principalmente por los receptores purinérgicos P2Y y P2X y los receptores de adenosina. Algunos receptores P2Y, son capaces de hiperpolarizar la microglía lo cual se traduce en una inhibición de la producción de mediadores pro inflamatorios en enfermedades del sistema nervioso central como la esclerosis múltiple o la neuropatía periférica (Sperlagh and Illes, 2007). Además, en otras patologías neurodegenerativas como el Parkinson, ha sido establecida la relación del aumento de la expresión del receptor P2Y<sub>6</sub> y la microglía (Yang et al., 2017). A pesar de la falta de viabilidad de los ensayos de Fura-2 AM en relación al Ap<sub>4</sub>A y a las células de la microglía (debido a la gran concentración requerida para valorar una respuesta sostenida por el tipo de experimentación) consideramos que conocer el papel del Ap<sub>4</sub>A en condiciones de glaucoma en estas células podría resultar de gran utilidad.

Aunque el papel del ATP a nivel de la retina ha sido previamente estudiado en las células del epitelio pigmentado de la retina humana o células ARPE-19 (Mitchell, 2001) poco se sabe acerca de la función del Ap<sub>4</sub>A en la misma. El conocimiento sobre el papel que juega el Ap<sub>4</sub>A a nivel de la retina en el glaucoma resulta de especial relevancia debido a que los diadenosina polifosfatos (Ap<sub>n</sub>A) sirven como agentes neuromoduladores de los receptores P2 y están directamente relacionados con mecanismos fisiológicos en el sistema nervioso (Miras-Portugal et al., 1999, Delicado et al., 2006). Dichos mecanismos de modulación en la retina a través de los receptores P2 se realizan después de ser liberados desde las terminaciones nerviosas (Reigada et al., 2008).

En nuestros experimentos, al medir la respuesta de fluorescencia en las células del epitelio pigmentario de la retina humana o ARPE-19 en presencia del Ap<sub>4</sub>A, obtuvimos una respuesta positiva. Más aún, analizando la interacción de los receptores de estudio P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> cuando se realizaban las mismas medidas

de fluorescencia en presencia de los antagonistas, se produjeron cambios en la liberación de calcio al medio intracelular en aquellas células que se analizaron en presencia de los antagonistas de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub>. Estudios previos han demostrado la presencia de las ectonucleotidasas en las células ARPE-19 y que estas enzimas están directamente relacionados con la degradación del ATP en ADP, cuyos efectos están mediados por los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> (Reigada et al., 2005). Al antagonizar el receptor P2Y<sub>1</sub> se pudo observar un descenso de los niveles de calcio. Además, ha sido descrito que al activar el receptor P2Y<sub>2</sub> con el agonista INS37217, se aumenta la reabsorción del fluido en el desprendimiento de retina (Maminishkis et al., 2002, Meyer et al., 2002). Esto puede ser debido a que un aumento en los niveles de calcio es concomitante con el aumento de marcadores apoptóticos. Los niveles de calcio medidos durante la experimentación del presente trabajo estaban significativamente incrementados con respecto a aquellas células que fueron tratadas únicamente con Ap<sub>4</sub>A. Como se ha comentado con anterioridad, los niveles de ATP elevados causan muerte celular, y que en el caso de nuestro modelo glaucomatoso estos niveles están significativamente elevados (Perez de Lara et al., 2014); en un estudio reciente acerca de la concentración del Ap<sub>4</sub>A en la retina de ratones glaucomatosos DBA/2J se pudo observar que esta estaba incrementada a los 23 meses de edad, comparándolo con los valores basales (Perez de Lara et al., 2018). Si tenemos en cuenta que el Ap<sub>4</sub>A es considerado una molécula cuya concentración se incrementa como consecuencia de las variaciones del entorno estos resultados sugieren que el Ap<sub>4</sub>A podría tener un efecto de protección en la retina. La modulación de los receptores purinérgicos, en particular el P2Y<sub>2</sub> podría mantener más bajos los niveles de ATP en esta capa de la retina, conservándola en mejores condiciones y por lo tanto conservando a su vez la capa de los conos y bastones. Respecto a los resultados obtenidos cuando antagonizamos el receptor P2Y<sub>6</sub>, sabemos que existen estudios en estas células que relacionan el incremento de las citoquinas pro-inflamatorias y dicho receptor (Relvas et al., 2009). Sin embargo, en condiciones normales, no observamos



ninguna variación en la respuesta de calcio en presencia del antagonista selectivo P2Y<sub>6</sub>.

En relación a la patología del glaucoma, varios estudios basados en la importancia de una detección precoz de la misma, muestran como la capa de células del EPR aparece modificada cuando se observa mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) (Asaoka et al., 2017). El EPR se encarga de los fenómenos de absorción y reflexión de la luz, de nutrir la capa de conos y bastones y su correcto funcionamiento es fundamental para el proceso de la visión (Bosch et al., 1993). Por lo tanto, una ampliación del conocimiento de esta capa de la retina acerca de su relación con el sistema purinérgico y el Ap<sub>4</sub>A sería interesante, completando los estudios a nivel de microglía o de células ganglionares.

A la vista de nuestros resultados, es importante remarcar que consideramos que sería necesario completar la información obtenida a partir de estos experimentos, tanto en células de la microglía BV-2 como en las células ARPE-19 mediante nuevos ensayos en condiciones que simulen el glaucoma y el deterioro que se produce en la retina durante el proceso de degeneración asociado al glaucoma para poder obtener nuevos datos que nos permitan ampliar el conocimiento sobre el papel del Ap<sub>4</sub>A en la retina en la patología del glaucoma.

## Conclusiones/Conclusions



## CONCLUSIONES

El objetivo de esta tesis ha sido establecer una relación entre el dinucleótido  $Ap_4A$  y los receptores purinérgicos  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  y  $P2Y_6$  en un modelo murino de glaucoma con hipertensión ocular, profundizando en el conocimiento de la patología y de estos receptores. Por lo tanto, del presente trabajo experimental se extraen las siguientes conclusiones:

1. Los receptores purinérgicos  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  y  $P2Y_6$  están presentes en los procesos ciliares de los ojos de los ratones glaucomatosos DBA/2J y presentan una variación con el desarrollo de la patología, que nos indica que estos cambios están relacionados con el aumento de la PIO y en especial con la elevada expresión del receptor  $P2Y_2$  encontrada a los 9 meses de edad.
2. El  $Ap_4A$  es capaz de reducir la PIO tanto en ratones normotensos como en ratones glaucomatosos, siendo esta reducción un 25% superior en los ratones DBA/2J comparado con los ratones normotensos C56BL/6J.
3. El tratamiento continuado con  $Ap_4A$  consigue ralentizar el aumento intrínseco de la PIO en los ratones DBA/2J, con tan solo una aplicación de 3 veces a la semana durante 3 meses.
4. En combinación con fármacos comerciales, el pretratamiento con  $Ap_4A$  es capaz de potenciar el efecto hipotensor de estos, aportando mayor eficacia que cuando actúan a la vez ambos compuestos.
5. El  $Ap_4A$  puede estimular las células microgliales de ratón, provocando una respuesta en las mismas, lo que indica una relación entre ambos y sugiere un posible efecto neuroprotector del dinucleótido.

6. El  $\text{Ap}_4\text{A}$  estimula e interactúa con las células del epitelio pigmentado de la retina, modulando su respuesta principalmente a través del receptor  $\text{P2Y}_2$ .
7. El dinucleótido  $\text{Ap}_4\text{A}$  es un buen candidato para el tratamiento del glaucoma gracias a su efecto hipotensor, a su habilidad para potenciar fármacos comerciales y a su posible acción neuroprotectora, lo que lo convierte en un posible fármaco que aborda diferentes problemas asociados al glaucoma.

## CONCLUSIONS

The aim of the thesis has been to establish a relationship between the dinucleotide  $Ap_4A$  and the purinergic receptors  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  y  $P2Y_6$  in a murine model of glaucoma, widening the knowledge of the pathology and these receptors. Thus, we can conclude that:

1. Purinergic receptors  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  and  $P2Y_6$  are present in the ciliary body of the glaucomatous DBA/2J mice eye, changing with the development of the pathology in these animals and suggesting that these variations are related to the increase of the intraocular pressure, mainly to the elevated expression of  $P2Y_2$  in old mice.
2.  $Ap_4A$  is able to reduce IOP in both normotensive and glaucomatous mice strains, but especially in DBA/2J mice (approximately 25% compared to C57BL/6J).
3. The continuous treatment with  $Ap_4A$  can slow down the IOP rise due to the pathology in DBA/2J mice by a single instillation 3 times a week for 3 months.
4. In combination with commercial drugs,  $Ap_4A$  pre-treatment is able to enhance the hypotensive effect of these drugs, providing a higher efficiency when acting together.
5.  $Ap_4A$  can stimulate mice microglial cells causing a response into them, which suggests a relation among the dinucleotide and the neuroprotective effect of the microglia.

6.  $\text{Ap}_4\text{A}$  interacts and stimulate the retinal pigmentary epithelium cells, modulating the response mainly by the  $\text{P2Y}_2$  receptor.
7. The dinucleotide  $\text{Ap}_4\text{A}$  is a good candidate for the treatment of glaucoma due to its hypotensive effect, its ability to enhance commercial drugs and its neuroprotective characteristics, making of it a potential drug that can solve different problems related to glaucoma.

## Referencias





## REFERENCIAS

- ABBRACCHIO, M. P., BOEYNAEMS, J. M., BARNARD, E. A., BOYER, J. L., KENNEDY, C., MIRAS-PORTUGAL, M. T., KING, B. F., GACHET, C., JACOBSON, K. A., WEISMAN, G. A. & BURNSTOCK, G. 2003. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci*, 24, 52-5.
- ABBRACCHIO, M. P., BURNSTOCK, G., BOEYNAEMS, J. M., BARNARD, E. A., BOYER, J. L., KENNEDY, C., KNIGHT, G. E., FUMAGALLI, M., GACHET, C., JACOBSON, K. A. & WEISMAN, G. A. 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev*, 58, 281-341.
- ABU-HASSAN, D. W., ACOTT, T. S. & KELLEY, M. J. 2014. The Trabecular Meshwork: A Basic Review of Form and Function. *J Ocul Biol*, 2.
- AIELLO, L. P., AVERY, R. L., ARRIGG, P. G., KEYT, B. A., JAMPEL, H. D., SHAH, S. T., PASQUALE, L. R., THIEME, H., IWAMOTO, M. A., PARK, J. E. & ET AL. 1994. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*, 331, 1480-7.
- AIHARA, M., LINDSEY, J. D. & WEINREB, R. N. 2003. Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 4314-20.
- ALOISI, F. 2001. Immune function of microglia. *Glia*, 36, 165-79.
- ALSBIRK, P. H. 1976. Primary angle-closure glaucoma. Oculometry, epidemiology, and genetics in a high risk population. *Acta Ophthalmol Suppl*, 5-31.
- ALWARD, W. L. 1998. Medical management of glaucoma. *N Engl J Med*, 339, 1298-307.
- ANDERSON, M. G., LIBBY, R. T., MAO, M., COSMA, I. M., WILSON, L. A., SMITH, R. S. & JOHN, S. W. 2006. Genetic context determines susceptibility to intraocular pressure elevation in a mouse pigmentary glaucoma. *BMC Biol*, 4, 20.
- ANDERSON, M. G., SMITH, R. S., HAWES, N. L., ZABALETA, A., CHANG, B., WIGGS, J. L. & JOHN, S. W. 2002. Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet*, 30, 81-5.
- ANDERSON, M. G., SMITH, R. S., SAVINOVA, O. V., HAWES, N. L., CHANG, B., ZABALETA, A., WILPAN, R., HECKENLIVELY, J. R., DAVISSON, M. & JOHN, S. W. 2001. Genetic modification of glaucoma associated phenotypes between AKXD-28/Ty and DBA/2J mice. *BMC Genet*, 2, 1.
- ASAOKA, R., MURATA, H., YANAGISAWA, M., FUJINO, Y., MATSUURA, M., INOUE, T., INOUE, K. & YAMAGAMI, J. 2017. The association between photoreceptor layer thickness measured by optical coherence tomography and visual sensitivity in glaucomatous eyes. *PLoS One*, 12, e0184064.
- ASRANI, S., ZEIMER, R., WILENSKY, J., GIESER, D., VITALE, S. & LINDENMUTH, K. 2000. Large diurnal fluctuations in intraocular pressure are an independent risk factor in patients with glaucoma. *J Glaucoma*, 9, 134-42.
- BAILEY, J. N., LOOMIS, S. J., KANG, J. H., ALLINGHAM, R. R., GHARAHKHANI, P., KHOR, C. C., BURDON, K. P., ASCHARD, H., CHASMAN, D. I., IGO, R. P., JR., HYSI, P. G., GLASTONBURY, C. A., ASHLEY-KOCH, A., BRILLIANT, M., BROWN, A. A., BUDENZ, D. L., BUIL, A., CHENG, C. Y., CHOI, H., CHRISTEN, W. G., CURHAN, G., DE VIVO, I., FINGERT, J. H., FOSTER, P. J., FUCHS, C., GAASTERLAND, D., GAASTERLAND, T., HEWITT, A. W., HU, F., HUNTER, D. J., KHAWAJA, A. P., LEE, R. K., LI, Z.,

- LICHTER, P. R., MACKEY, D. A., MCGUFFIN, P., MITCHELL, P., MOROI, S. E., PERERA, S. A., PEPPER, K. W., QI, Q., REALINI, T., RICHARDS, J. E., RIDKER, P. M., RIMM, E., RITCH, R., RITCHIE, M., SCHUMAN, J. S., SCOTT, W. K., SINGH, K., SIT, A. J., SONG, Y. E., TAMIMI, R. M., TOPOUZIS, F., VISWANATHAN, A. C., VERMA, S. S., VOLLRATH, D., WANG, J. J., WEISSCHUH, N., WISSINGER, B., WOLLSTEIN, G., WONG, T. Y., YASPER, B. L., ZACK, D. J., ZHANG, K., STUDY, E. N., CONSORTIUM, A., WEINREB, R. N., PERICAK-VANCE, M. A., SMALL, K., HAMMOND, C. J., AUNG, T., LIU, Y., VITHANA, E. N., MACGREGOR, S., CRAIG, J. E., KRAFT, P., HOWELL, G., HAUSER, M. A., PASQUALE, L. R., HAINES, J. L. & WIGGS, J. L. 2016. Genome-wide association analysis identifies TXNRD2, ATXN2 and FOXC1 as susceptibility loci for primary open-angle glaucoma. *Nat Genet*, 48, 189-94.
- BALOGH, J., WIHLBORG, A. K., ISACKSON, H., JOSHI, B. V., JACOBSON, K. A., ARNER, A. & ERLINGE, D. 2005. Phospholipase C and cAMP-dependent positive inotropic effects of ATP in mouse cardiomyocytes via P2Y11-like receptors. *J Mol Cell Cardiol*, 39, 223-30.
- BAR, I., GUNS, P. J., METALLO, J., CAMMARATA, D., WILKIN, F., BOEYNAMS, J. M., BULT, H. & ROBAYE, B. 2008. Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 74, 777-84.
- BARANY, E. & KINSEY, V. E. 1949. The rate of flow of aqueous humor; the rate of disappearance of para-aminohippuric acid, radioactive rayopake, and radioactive diodrast from the aqueous humor of rabbits. *Am J Ophthalmol*, 32 Pt. 2, 177-88.
- BARANY, E. H. 1966. The mode of action of miotics on outflow resistance. A study of pilocarpine in the vervet monkey *Cercopithecus ethiops*. *Trans Ophthalmol Soc U K*, 86, 539-78.
- BAYER, A. U., COOK, P., BRODIE, S. E., MAAG, K. P. & MITTAG, T. 2001. Evaluation of different recording parameters to establish a standard for flash electroretinography in rodents. *Vision Res*, 41, 2173-85.
- BECKERS, H. J., SCHOUTEN, J. S., WEBERS, C. A., VAN DER VALK, R. & HENDRIKSE, F. 2008. Side effects of commonly used glaucoma medications: comparison of tolerability, chance of discontinuation, and patient satisfaction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246, 1485-90.
- BELGHITH, A., MEDEIROS, F. A., BOWD, C., LIEBMANN, J. M., GIRKIN, C. A., WEINREB, R. N. & ZANGWILL, L. M. 2016. Structural Change Can Be Detected in Advanced-Glaucoma Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57, OCT511-8.
- BENNETT, W. D., OLIVIER, K. N., ZEMAN, K. L., HOHNEKER, K. W., BOUCHER, R. C. & KNOWLES, M. R. 1996. Effect of uridine 5'-triphosphate plus amiloride on mucociliary clearance in adult cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 153, 1796-801.
- BENOZZI, J., NAHUM, L. P., CAMPANELLI, J. L. & ROSENSTEIN, R. E. 2002. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 2196-200.
- BHOWMIK, D. K., K.; DEB, L.; PASWAN, S.; DUTTA, A.S. 2012. Glaucoma -A Eye Disorder Its Causes, Risk Factor, Prevention and Medication. *The Pharma Journal*, 1, 66-81.
- BILL, A. 1973. The role of ciliary blood flow and ultrafiltration in aqueous humor formation. *Exp Eye Res*, 16, 287-98.
- BISHOP, P. N., TAKANOSU, M., LE GOFF, M. & MAYNE, R. 2002. The role of the posterior ciliary body in the biosynthesis of vitreous humour. *Eye (Lond)*, 16, 454-60.
- BOK, D. 1993. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl*, 17, 189-95.
- BOSCH, E., HORWITZ, J. & BOK, D. 1993. Phagocytosis of outer segments by

- retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *J Histochem Cytochem*, 41, 253-63.
- BOSCO, A., STEELE, M. R. & VETTER, M. L. 2011. Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *J Comp Neurol*, 519, 599-620.
- BOURNE, R. R., TAYLOR, H. R., FLAXMAN, S. R., KEEFFE, J., LEASHER, J., NAIDOO, K., PESUDOV, K., WHITE, R. A., WONG, T. Y., RESNIKOFF, S. & JONAS, J. B. 2016. Number of People Blind or Visually Impaired by Glaucoma Worldwide and in World Regions 1990 - 2010: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 11, e0162229.
- BOUSSOMMIER-CALLEJA, A., BERTRAND, J., WOODWARD, D. F., ETHIER, C. R., STAMER, W. D. & OVERBY, D. R. 2012. Pharmacologic manipulation of conventional outflow facility in ex vivo mouse eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 5838-45.
- BROWN, J. C., SADLER, P. J., SPALTON, D. J., JUUL, S. M., MACLEOD, A. F. & SONKSEN, P. H. 1986. Analysis of human aqueous humour by high resolution 1H NMR spectroscopy. *Exp Eye Res*, 42, 357-62.
- BRUBAKER, R. F. 1991. Flow of aqueous humor in humans [The Friedenwald Lecture]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32, 3145-66.
- BRUBAKER, R. F., SCHOFF, E. O., NAU, C. B., CARPENTER, S. P., CHEN, K. & VANDENBURGH, A. M. 2001. Effects of AGN 192024, a new ocular hypotensive agent, on aqueous dynamics. *Am J Ophthalmol*, 131, 19-24.
- BRUSINI, P. & JOHNSON, C. A. 2007. Staging functional damage in glaucoma: review of different classification methods. *Surv Ophthalmol*, 52, 156-79.
- BURGOYNE, C. F., DOWNS, J. C., BELLEZZA, A. J., SUH, J. K. & HART, R. T. 2005. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog Retin Eye Res*, 24, 39-73.
- BURNSTOCK, G. 1976. Purinergic receptors. *J Theor Biol*, 62, 491-503.
- BURNSTOCK, G. 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, 64, 1471-83.
- BURNSTOCK, G. 2014. Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp Physiol*, 99, 16-34.
- BURNSTOCK, G. 2016. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 371.
- BURNSTOCK, G. & KENNEDY, C. 1985. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol*, 16, 433-40.
- BURNSTOCK, G. & KNIGHT, G. E. 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol*, 240, 31-304.
- BURNSTOCK, G. & VOLONTE, C. 2012. Pharmacology and therapeutic activity of purinergic drugs for disorders of the nervous system. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11, 649-51.
- CANTOR, L. B. 1989. Systemic side effects of glaucoma medications. *Indiana Med*, 82, 105-7.
- CARRACEDO, G., CROOKE, A., GUZMAN-ARANGUEZ, A., PEREZ DE LARA, M. J., MARTIN-GIL, A. & PINTOR, J. 2016. The role of dinucleoside polyphosphates on the ocular surface and other eye structures. *Prog Retin Eye Res*, 55, 182-205.
- CARTA, F., SUPURAN, C. T. & SCOZZAFAVA, A. 2012. Novel therapies for glaucoma: a patent review 2007 - 2011. *Expert Opin Ther Pat*, 22, 79-88.
- CASSON, R. J. 2012. Pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Clin Exp Ophthalmol*, 40, 838-9.
- CASTANY, M., JORDI, I., CATALA, J., GUAL, A., MORALES, M., GASULL, X. & PINTOR, J. 2011. Glaucoma patients present increased levels of diadenosine tetraphosphate, Ap(4)A, in the aqueous humour. *Exp Eye Res*, 92, 221-6.
- CHANDRA, S., MUIR, E. R., DEO, K., KIEL, J. W. & DUONG, T. Q. 2016. Effects of

- Dorzolamide on Retinal and Choroidal Blood Flow in the DBA/2J Mouse Model of Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57, 826-31.
- CHANG, B., SMITH, R. S., HAWES, N. L., ANDERSON, M. G., ZABALETA, A., SAVINOVA, O., RODERICK, T. H., HECKENLIVELY, J. R., DAVISSON, M. T. & JOHN, S. W. 1999. Interacting loci cause severe iris atrophy and glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet*, 21, 405-9.
- CHAUHAN, B. C., O'LEARY, N., ALMOBARAK, F. A., REIS, A. S. C., YANG, H., SHARPE, G. P., HUTCHISON, D. M., NICOLELA, M. T. & BURGOYNE, C. F. 2013. Enhanced detection of open-angle glaucoma with an anatomically accurate optical coherence tomography-derived neuroretinal rim parameter. *Ophthalmology*, 120, 535-543.
- CHAVDA, S., LUTHER, P. J. & SALT, T. E. 2016. P2X7R modulation of visually evoked synaptic responses in the retina. *Purinergic Signal*, 12, 611-625.
- CHOW, J., LITON, P. B., LUNA, C., WONG, F. & GONZALEZ, P. 2007. Effect of cellular senescence on the P2Y-receptor mediated calcium response in trabecular meshwork cells. *Mol Vis*, 13, 1926-33.
- CIVAN, M. M. & MACKNIGHT, A. D. 2004. The ins and outs of aqueous humor secretion. *Exp Eye Res*, 78, 625-31.
- CIVAN, M. M., PETERSON-YANTORNO, K., SANCHEZ-TORRES, J. & COCA-PRADOS, M. 1997. Potential contribution of epithelial Na<sup>+</sup> channel to net secretion of aqueous humor. *J Exp Zool*, 279, 498-503.
- CODDOU, C., YAN, Z., OBSIL, T., HUIDOBROTTO, J. P. & STOJILKOVIC, S. S. 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev*, 63, 641-83.
- COLE, D. F. 1977. Secretion of the aqueous humor. *Exp Eye Res*, 25 Suppl, 161-76.
- COMMUNI, D., GOVAERTS, C., PARMENTIER, M. & BOEYNAEMS, J. M. 1997. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, 272, 31969-73.
- COMMUNI, D., MOTTE, S., BOEYNAEMS, J. M. & PIROTON, S. 1996. Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *Eur J Pharmacol*, 317, 383-9.
- COMMUNI, D., ROYAYE, B. & BOEYNAEMS, J. M. 1999. Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *Br J Pharmacol*, 128, 1199-206.
- COWLEN, M. S., ZHANG, V. Z., WARNOCK, L., MOYER, C. F., PETERSON, W. M. & YERXA, B. R. 2003. Localization of ocular P2Y2 receptor gene expression by in situ hybridization. *Exp Eye Res*, 77, 77-84.
- CRAIN, J. M., NIKODEMOVA, M. & WATTERS, J. J. 2009. Expression of P2 nucleotide receptors varies with age and sex in murine brain microglia. *J Neuroinflammation*, 6, 24.
- CRISH, S. D., SAPPINGTON, R. M., INMAN, D. M., HORNER, P. J. & CALKINS, D. J. 2010. Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 5196-201.
- CROOKE, A., GUZMAN-ARANGUEZ, A., PERAL, A., ABDURRAHMAN, M. K. & PINTOR, J. 2008. Nucleotides in ocular secretions: their role in ocular physiology. *Pharmacol Ther*, 119, 55-73.
- CROOKE, A., HUETE-TORAL, F., MARTINEZ-AGUILA, A., MARTIN-GIL, A. & PINTOR, J. 2012. Involvement of carbonic anhydrases in the ocular hypotensive effect of melatonin analogue 5-MCA-NAT. *J Pineal Res*, 52, 265-70.
- CROSBIE, D. E., KEANEY, J., TAM, L. C. S., DANIEL STAMER, W., CAMPBELL, M. & HUMPHRIES, P. 2019. Age-related changes in eye morphology and aqueous humor dynamics in DBA/2J mice using contrast-enhanced ocular MRI. *Magn Reson Imaging*, 59, 10-16.
- CROSSON, C. E., YATES, P. W., BHAT, A. N., MUKHIN, Y. V. & HUSAIN, S. 2004. Evidence for multiple P2Y receptors in

- trabecular meshwork cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 309, 484-9.
- DAIMON, T., KAZAMA, M., MIYAJIMA, Y. & NAKANO, M. 1997. Immunocytochemical localization of thrombomodulin in the aqueous humor passage of the rat eye. *Histochem Cell Biol*, 108, 121-31.
- DANIAS, J., KONTIOLA, A. I., FILIPPOPOULOS, T. & MITTAG, T. 2003. Method for the noninvasive measurement of intraocular pressure in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 1138-41.
- DAVIS-SILBERMAN, N. & ASHERY-PADAN, R. 2008. Iris development in vertebrates; genetic and molecular considerations. *Brain Res*, 1192, 17-28.
- DELICADO, E. G., MIRAS-PORTUGAL, M. T., CARRASQUERO, L. M., LEON, D., PEREZ-SEN, R. & GUALIX, J. 2006. Dinucleoside polyphosphates and their interaction with other nucleotide signaling pathways. *Pflugers Arch*, 452, 563-72.
- DICKINSON, J. C., DURHAM, D. G. & HAMILTON, P. B. 1968. Ion exchange chromatography of free amino acids in aqueous fluid and lens of the human eye. *Invest Ophthalmol*, 7, 551-63.
- DÍEZ, J. E. B. & PUJOL, M. M. 2004. *Farmacología ocular*, Universitat Politècnica de Catalunya. Iniciativa Digital Politècnica.
- DIXON, S. J. & SIMS, S. M. 2000. P2 purinergic receptors on osteoblasts and osteoclasts: potential targets for drug development. *Drug Development Research*, 49, 187-200.
- DO, C. W. & CIVAN, M. M. 2004. Basis of chloride transport in ciliary epithelium. *J Membr Biol*, 200, 1-13.
- DRANCE, S., ANDERSON, D. R., SCHULZER, M. & COLLABORATIVE NORMAL-TENSION GLAUCOMA STUDY, G. 2001. Risk factors for progression of visual field abnormalities in normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 131, 699-708.
- EDWARDS, F. A., GIBB, A. J. & COLQUHOUN, D. 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*, 359, 144-7.
- EHONGO, A. & BREMER, F. 2007. [Ocular side effects of glaucoma treatment agents]. *Bull Soc Belge Ophtalmol*, 103-10.
- ELLIOTT, M. R., CHEKENI, F. B., TRAMPONT, P. C., LAZAROWSKI, E. R., KADL, A., WALK, S. F., PARK, D., WOODSON, R. I., OSTANKOVICH, M., SHARMA, P., LYSIAK, J. J., HARDEN, T. K., LEITINGER, N. & RAVICHANDRAN, K. S. 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461, 282-6.
- ELTZSCHIG, H. K., SITKOVSKY, M. V. & ROBSON, S. C. 2012. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med*, 367, 2322-33.
- ERB, L., LIAO, Z., SEYE, C. I. & WEISMAN, G. A. 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch*, 452, 552-62.
- ERICKSON-LAMY, K., SCHROEDER, A. & EPSTEIN, D. L. 1992. Ethacrynic acid induces reversible shape and cytoskeletal changes in cultured cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33, 2631-40.
- FARAHBAKHS, N. A. & CILLUFFO, M. C. 2002. P2 purinergic receptor-coupled signaling in the rabbit ciliary body epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 2317-25.
- FAUTSCH, M. P. & JOHNSON, D. H. 2006. Aqueous humor outflow: what do we know? Where will it lead us? *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 4181-7.
- FERNANDES, K. A., HARDER, J. M., WILLIAMS, P. A., RAUSCH, R. L., KIERNAN, A. E., NAIR, K. S., ANDERSON, M. G., JOHN, S. W., HOWELL, G. R. & LIBBY, R. T. 2015. Using genetic mouse models to gain insight into glaucoma: Past results and future possibilities. *Exp Eye Res*, 141, 42-56.
- FERNANDEZ-DURANGO, R., SANCHEZ, D. & FERNANDEZ-CRUZ, A. 1990. Identification of glucagon receptors in rat retina. *J Neurochem*, 54, 1233-7.
- FISCHER, W. & KRUGEL, U. 2007. P2Y receptors: focus on structural,



- pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr Med Chem*, 14, 2429-55.
- FLEISCHHAUER, J. C., LIU, R., ELENA, P. P., FLAMMER, J. & HAEFLIGER, I. O. 2001. Topical ocular instillation of nitric oxide synthase inhibitors and intraocular pressure in rabbits. *Klin Monbl Augenheilkd*, 218, 351-3.
- FORRESTER, J. V., DICK, A. D., MCMENAMIN, P. G., ROBERTS, F. & PEARLMAN, E. 2016. Chapter 3 - Genetics. *The Eye (Fourth Edition)*. W.B. Saunders.
- FOSTER, P. J., BUHRMANN, R., QUIGLEY, H. A. & JOHNSON, G. J. 2002. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol*, 86, 238-42.
- FOSTER, P. J., DEVEREUX, J. G., ALSBIRK, P. H., LEE, P. S., URANCHIMEG, D., MACHIN, D., JOHNSON, G. J. & BAASANHU, J. 2000. Detection of gonioscopically occludable angles and primary angle closure glaucoma by estimation of limbal chamber depth in Asians: modified grading scheme. *Br J Ophthalmol*, 84, 186-92.
- FRIES, J. E., WHEELER-SCHILLING, T. H., KOHLER, K. & GUENTHER, E. 2004. Distribution of metabotropic P2Y receptors in the rat retina: a single-cell RT-PCR study. *Brain Res Mol Brain Res*, 130, 1-6.
- FROGER, N., CADETTI, L., LORACH, H., MARTINS, J., BEMELMANS, A. P., DUBUS, E., DEGARDIN, J., PAIN, D., FORSTER, V., CHICAUD, L., IVKOVIC, I., SIMONUTTI, M., FOUQUET, S., JAMMOUL, F., LEVEILLARD, T., BENOSMAN, R., SAHEL, J. A. & PICAUD, S. 2012. Taurine provides neuroprotection against retinal ganglion cell degeneration. *PLoS One*, 7, e42017.
- GAASTERLAND, D. & KUPFER, C. 1974. Experimental glaucoma in the rhesus monkey. *Invest Ophthalmol*, 13, 455-7.
- GALLEGO, B. I., SALAZAR, J. J., DE HOZ, R., ROJAS, B., RAMIREZ, A. I., SALINAS-NAVARRO, M., ORTIN-MARTINEZ, A., VALIENTE-SORIANO, F. J., AVILES-TRIGUEROS, M., VILLEGAS-PEREZ, M. P., VIDAL-SANZ, M., TRIVINO, A. & RAMIREZ, J. M. 2012. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J Neuroinflammation*, 9, 92.
- GEDDE, S. J., SINGH, K., SCHIFFMAN, J. C., FEUER, W. J. & TUBE VERSUS TRABECULECTOMY STUDY, G. 2012. The Tube Versus Trabeculectomy Study: interpretation of results and application to clinical practice. *Curr Opin Ophthalmol*, 23, 118-26.
- GELATT, K. N. & MACKAY, E. O. 1998. The ocular hypertensive effects of topical 0.1% dexamethasone in beagles with inherited glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther*, 14, 57-66.
- GEROMETTA, R., PODOS, S. M., CANDIA, O. A., WU, B., MALGOR, L. A., MITTAG, T. & DANIAS, J. 2004. Steroid-induced ocular hypertension in normal cattle. *Arch Ophthalmol*, 122, 1492-7.
- GEROMETTA, R., PODOS, S. M., DANIAS, J. & CANDIA, O. A. 2009. Steroid-induced ocular hypertension in normal sheep. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 669-73.
- GEVER, J. R., COCKAYNE, D. A., DILLON, M. P., BURNSTOCK, G. & FORD, A. P. 2006. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch*, 452, 513-37.
- GHOSH, S., LEE, S., BROWN, T. A., BASU, M., HAWES, J. W., DAVIDSON, D. & BASU, S. 1991. Use of exoglycosidases from *Mercenaria mercenaria* (hard shelled clam) as a tool for structural studies of glycosphingolipids and glycoproteins. *Anal Biochem*, 196, 252-61.
- GOEL, M., PICCIANI, R. G., LEE, R. K. & BHATTACHARYA, S. K. 2010. Aqueous humor dynamics: a review. *Open Ophthalmol J*, 4, 52-9.
- GOLDBLUM, D., KONTIOLA, A. I., MITTAG, T., CHEN, B. & DANIAS, J. 2002. Non-invasive determination of intraocular pressure in the rat eye. Comparison of an electronic tonometer (TonoPen), and a rebound (impact probe) tonometer. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 240, 942-6.

- GOLDMANN, H. 1950. [New points of view in treatment of glaucoma]. *Bull Schweiz Akad Med Wiss*, 6, 423-31.
- GRANT, W. M. 1958. Further studies on facility of flow through the trabecular meshwork. *AMA Arch Ophthalmol*, 60, 523-33.
- GRIERSON, I. & LEE, W. R. 1978. Pressure effects on flow channels in the lining endothelium of Schlemm's canal. A quantitative study by transmission electron microscopy. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 56, 935-52.
- GRIESHABER, M. C. & FLAMMER, J. 2010. Is the medication used to achieve the target intraocular pressure in glaucoma therapy of relevance?--an exemplary analysis on the basis of two beta-blockers. *Prog Retin Eye Res*, 29, 79-93.
- GROVER, D. S., SMITH, O., FELLMAN, R. L., GODFREY, D. G., BUTLER, M. R., MONTES DE OCA, I. & FEUER, W. J. 2015. Gonioscopy assisted transluminal trabeculotomy: an ab interno circumferential trabeculotomy for the treatment of primary congenital glaucoma and juvenile open angle glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 99, 1092-6.
- GROZDANIC, S. D., BETTS, D. M., SAKAGUCHI, D. S., ALLBAUGH, R. A., KWON, Y. H. & KARDON, R. H. 2003. Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 4337-46.
- GUZMAN-ARANGUEZ, A., CROOKE, A., PERAL, A., HOYLE, C. H. & PINTOR, J. 2007. Dinucleoside polyphosphates in the eye: from physiology to therapeutics. *Prog Retin Eye Res*, 26, 674-87.
- GUZMAN-ARANGUEZ, A., DIEZ, L. M., MARTIN-GIL, A., GUALIX, J., MIRAS-PORTUGAL, M. T. & PINTOR, J. 2012. Effect of diinosine polyphosphates on intraocular pressure in normotensive rabbits. *Exp Eye Res*, 101, 49-55.
- GUZMAN-ARANGUEZ, A., SANTANO, C., MARTIN-GIL, A., FONSECA, B. & PINTOR, J. 2013. Nucleotides in the eye: focus on functional aspects and therapeutic perspectives. *J Pharmacol Exp Ther*, 345, 331-41.
- HARA, K., LUTJEN-DRECOLL, E., PRESTEL, H. & ROHEN, J. W. 1977. Structural differences between regions of the ciliary body in primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 16, 912-24.
- HARAZNY, J., SCHOLZ, M., BUDER, T., LAUSEN, B. & KREMERS, J. 2009. Electrophysiological deficits in the retina of the DBA/2J mouse. *Doc Ophthalmol*, 119, 181-97.
- HAYNES, S. E., HOLLOPETER, G., YANG, G., KURPIUS, D., DAILEY, M. E., GAN, W. B. & JULIUS, D. 2006. The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci*, 9, 1512-9.
- HE, M., FOSTER, P. J., GE, J., HUANG, W., ZHENG, Y., FRIEDMAN, D. S., LEE, P. S. & KHAW, P. T. 2006. Prevalence and clinical characteristics of glaucoma in adult Chinese: a population-based study in Liwan District, Guangzhou. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 2782-8.
- HEIJL, A., BENGTSSON, B., HYMAN, L., LESKE, M. C. & EARLY MANIFEST GLAUCOMA TRIAL, G. 2009. Natural history of open-angle glaucoma. *Ophthalmology*, 116, 2271-6.
- HEIJL, A., LESKE, M. C., BENGTSSON, B., HYMAN, L., BENGTSSON, B., HUSSEIN, M. & EARLY MANIFEST GLAUCOMA TRIAL, G. 2002. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol*, 120, 1268-79.
- HENN, A., LUND, S., HEDTJARN, M., SCHRATTENHOLZ, A., PORZGEN, P. & LEIST, M. 2009. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX*, 26, 83-94.
- HODGES, R. R., VROUVLIANIS, J., SHATOS, M. A. & DARTT, D. A. 2009. Characterization of P2X<sub>7</sub> purinergic receptors and their function in rat lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 5681-9.



- HOLLOPETER, G., JANTZEN, H. M., VINCENT, D., LI, G., ENGLAND, L., RAMAKRISHNAN, V., YANG, R. B., NURDEN, P., NURDEN, A., JULIUS, D. & CONLEY, P. B. 2001. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, 409, 202-7.
- HOWELL, G. R., LIBBY, R. T., JAKOBS, T. C., SMITH, R. S., PHALAN, F. C., BARTER, J. W., BARBAY, J. M., MARCHANT, J. K., MAHESH, N., PORCIATTI, V., WHITMORE, A. V., MASLAND, R. H. & JOHN, S. W. 2007. Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J Cell Biol*, 179, 1523-37.
- HOYLE, C. H. & PINTOR, J. J. 2010. Diadenosine tetraphosphate protects sympathetic terminals from 6-hydroxydopamine-induced degeneration in the eye. *Acta Physiol (Oxf)*, 199, 205-10.
- INMAN, D. M., LAMBERT, W. S., CALKINS, D. J. & HORNER, P. J. 2013. alpha-Lipoic acid antioxidant treatment limits glaucoma-related retinal ganglion cell death and dysfunction. *PLoS One*, 8, e65389.
- INMAN, D. M., SAPPINGTON, R. M., HORNER, P. J. & CALKINS, D. J. 2006. Quantitative correlation of optic nerve pathology with ocular pressure and corneal thickness in the DBA/2 mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 986-96.
- JACKSON, T. L., KWAN, A. S., LAIDLAW, A. H. & AYLWARD, W. 2007. Identification of retinal breaks using subretinal trypan blue injection. *Ophthalmology*, 114, 587-90.
- JACOBSON, K. A. 2010. P2X and P2Y receptors. *Tocris Rev*, 33, 1-16.
- JACOBSON, K. A., BALASUBRAMANIAN, R., DEFLORIAN, F. & GAO, Z. G. 2012. G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions. *Purinergic Signal*, 8, 419-36.
- JAY, W. M. & GREEN, K. 1983. Multiple-drop study of topically applied 1% delta 9-tetrahydrocannabinol in human eyes. *Arch Ophthalmol*, 101, 591-3.
- JOHN, S. W., SMITH, R. S., SAVINOVA, O. V., HAWES, N. L., CHANG, B., TURNBULL, D., DAVISSON, M., RODERICK, T. H. & HECKENLIVELY, J. R. 1998. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39, 951-62.
- JONAS, J. 1992. Biomorphometry and histomorphometry of the optic disc with special reference to the parapapillary region. *Bull Soc Belge Ophtalmol*, 244, 45-60.
- JONAS, J. B., AUNG, T., BOURNE, R. R., BRON, A. M., RITCH, R. & PANDA-JONAS, S. 2017. Glaucoma. *Lancet*, 390, 2183-2193.
- JONAS, R. A., YUAN, T. F., LIANG, Y. X., JONAS, J. B., TAY, D. K. & ELLIS-BEHNKE, R. G. 2012. The spider effect: morphological and orienting classification of microglia in response to stimuli in vivo. *PLoS One*, 7, e30763.
- KAPETANAKIS, V. V., CHAN, M. P., FOSTER, P. J., COOK, D. G., OWEN, C. G. & RUDNICKA, A. R. 2016. Global variations and time trends in the prevalence of primary open angle glaucoma (POAG): a systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol*, 100, 86-93.
- KASS, M. A., HEUER, D. K., HIGGINBOTHAM, E. J., JOHNSON, C. A., KELTNER, J. L., MILLER, J. P., PARRISH, R. K., 2ND, WILSON, M. R. & GORDON, M. O. 2002. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 120, 701-13; discussion 829-30.
- KAUR, C., RATHNASAMY, G. & LING, E. A. 2013. Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8, 66-78.
- KAWAMURA, H., SUGIYAMA, T., WU, D. M., KOBAYASHI, M., YAMANISHI, S., KATSUMURA, K. & PURO, D. G. 2003. ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature

- of the rat retina. *J Physiol*, 551, 787-99.
- KERRIGAN-BAUMRIND, L. A., QUIGLEY, H. A., PEASE, M. E., KERRIGAN, D. F. & MITCHELL, R. S. 2000. Number of ganglion cells in glaucoma eyes compared with threshold visual field tests in the same persons. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 741-8.
- KHOR, C. C., DO, T., JIA, H., NAKANO, M., GEORGE, R., ABU-AMERO, K., DUVESH, R., CHEN, L. J., LI, Z., NONGPIUR, M. E., PERERA, S. A., QIAO, C., WONG, H. T., SAKAI, H., BARBOSA DE MELO, M., LEE, M. C., CHAN, A. S., AZHANY, Y., DAO, T. L., IKEDA, Y., PEREZ-GROSSMANN, R. A., ZARNOWSKI, T., DAY, A. C., JONAS, J. B., TAM, P. O., TRAN, T. A., AYUB, H., AKHTAR, F., MICHEAL, S., CHEW, P. T., ALJASIM, L. A., DADA, T., LUU, T. T., AWADALLA, M. S., KITNARONG, N., WANICHWECHARUNGRUANG, B., AUNG, Y. Y., MOHAMED-NOOR, J., VIJAYAN, S., SARANGAPANI, S., HUSAIN, R., JAP, A., BASKARAN, M., GOH, D., SU, D. H., WANG, H., YONG, V. K., YIP, L. W., TRINH, T. B., MAKORNWATTANA, M., NGUYEN, T. T., LEUENBERGER, E. U., PARK, K. H., WIYOGO, W. A., KUMAR, R. S., TELLO, C., KURIMOTO, Y., THAPA, S. S., PATHANAPITON, K., SALMON, J. F., SOHN, Y. H., FEA, A., OZAKI, M., LAI, J. S., TANTISEVI, V., KHAING, C. C., MIZOGUCHI, T., NAKANO, S., KIM, C. Y., TANG, G., FAN, S., WU, R., MENG, H., NGUYEN, T. T., TRAN, T. D., UENO, M., MARTINEZ, J. M., RAMLI, N., AUNG, Y. M., REYES, R. D., VERNON, S. A., FANG, S. K., XIE, Z., CHEN, X. Y., FOO, J. N., SIM, K. S., WONG, T. T., QUEK, D. T., VENKATESH, R., KAVITHA, S., KRISHNADAS, S. R., SOUMITTRA, N., SHANTHA, B., LIM, B. A., OGLE, J., DE VASCONCELLOS, J. P., COSTA, V. P., ABE, R. Y., DE SOUZA, B. B., SNG, C. C., et al. 2016. Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for primary angle closure glaucoma. *Nat Genet*, 48, 556-62.
- KIM, Y. C., CHIANG, B., WU, X. & PRAUSNITZ, M. R. 2014. Ocular delivery of macromolecules. *J Control Release*, 190, 172-81.
- KLEPEIS, V. E., WEINGER, I., KACZMAREK, E. & TRINKAUS-RANDALL, V. 2004. P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. *J Cell Biochem*, 93, 1115-33.
- KO, F., PAPADOPOULOS, M. & KHAW, P. T. 2015. Primary congenital glaucoma. *Prog Brain Res*, 221, 177-89.
- KOIZUMI, S., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., NASUTADA, K., SHINOZAKI, Y., OHSAWA, K., TSUDA, M., JOSHI, B. V., JACOBSON, K. A., KOHSAKA, S. & INOUE, K. 2007. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*, 446, 1091-5.
- KRAUSE, U. & RAUNIO, V. 1969. Proteins of the normal human aqueous humour. *Ophthalmologica*, 159, 178-85.
- LAI, J. S., THAM, C. C. & LAM, D. S. 2002. Intracameral lidocaine in trabeculectomy. A preliminary safety and efficacy study. *Indian J Ophthalmol*, 50, 197-200.
- LANDERS, J., GOLDBERG, I. & GRAHAM, S. L. 2002. Analysis of risk factors that may be associated with progression from ocular hypertension to primary open angle glaucoma. *Clin Exp Ophthalmol*, 30, 242-7.
- LANGHAM, M. E. & TAYLOR, C. B. 1960. The influence of superior cervical ganglionectomy on intraocular dynamics. *J Physiol*, 152, 447-58.
- LAZAROWSKI, E. R., BOUCHER, R. C. & HARDEN, T. K. 2003. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol*, 64, 785-95.
- LAZAROWSKI, E. R., WATT, W. C., STUTTS, M. J., BOUCHER, R. C. & HARDEN, T. K. 1995. Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br J Pharmacol*, 116, 1619-27.

- LEE, A. J. & GOLDBERG, I. 2011. Emerging drugs for ocular hypertension. *Expert Opin Emerg Drugs*, 16, 137-61.
- LEI, Y., OVERBY, D. R., BOUSSOMMIER-CALLEJA, A., STAMER, W. D. & ETHIER, C. R. 2011. Outflow physiology of the mouse eye: pressure dependence and washout. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 1865-71.
- LEON, C., HECHLER, B., FREUND, M., ECKLY, A., VIAL, C., OHLMANN, P., DIERICH, A., LEMEURE, M., CAZENAVE, J. P. & GACHET, C. 1999. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest*, 104, 1731-7.
- LESTAK, J., TINTERA, J., SVATA, Z., ETTLER, L. & ROZSIVAL, P. 2014. Glaucoma and CNS. Comparison of fMRI results in high tension and normal tension glaucoma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 158, 144-53.
- LEVIN, L. A. & ADLER, F. H. 2011. *Adler's physiology of the eye* [Online]. [Accessed].
- LEVKOVITCH-VERBIN, H., QUIGLEY, H. A., MARTIN, K. R., VALENTA, D., BAUMRIND, L. A. & PEASE, M. E. 2002. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 402-10.
- LI, Y., HOLTZCLAW, L. A. & RUSSELL, J. T. 2001. Muller cell Ca<sup>2+</sup> waves evoked by purinergic receptor agonists in slices of rat retina. *J Neurophysiol*, 85, 986-94.
- LI, Z., ALLINGHAM, R. R., NAKANO, M., JIA, L., CHEN, Y., IKEDA, Y., MANI, B., CHEN, L. J., KEE, C., GARWAY-HEATH, D. F., SRIPRIYA, S., FUSE, N., ABU-AMERO, K. K., HUANG, C., NAMBURI, P., BURDON, K., PERERA, S. A., GHARAHKHANI, P., LIN, Y., UENO, M., OZAKI, M., MIZOGUCHI, T., KRISHNADAS, S. R., OSMAN, E. A., LEE, M. C., CHAN, A. S., TAJUDIN, L. S., DO, T., GONCALVES, A., REYNIER, P., ZHANG, H., BOURNE, R., GOH, D., BROADWAY, D., HUSAIN, R., NEGI, A. K., SU, D. H., HO, C. L., BLANCO, A. A., LEUNG, C. K., WONG, T. T., YAKUB, A., LIU, Y., NONGPIUR, M. E., HAN, J. C., HON, D. N., SHANTHA, B., ZHAO, B., SANG, J., ZHANG, N., SATO, R., YOSHII, K., PANDA-JONAS, S., ASHLEY KOCH, A. E., HERNDON, L. W., MOROI, S. E., CHALLA, P., FOO, J. N., BEI, J. X., ZENG, Y. X., SIMMONS, C. P., BICH CHAU, T. N., SHARMILA, P. F., CHEW, M., LIM, B., TAM, P. O., CHUA, E., NG, X. Y., YONG, V. H., CHONG, Y. F., MEAH, W. Y., VIJAYAN, S., SEONGSOO, S., XU, W., TEO, Y. Y., COOKE BAILEY, J. N., KANG, J. H., HAINES, J. L., CHENG, C. Y., SAW, S. M., TAI, E. S., CONSORTIUM, I. C.-G., CONSORTIUM, N., RICHARDS, J. E., RITCH, R., GAASTERLAND, D. E., PASQUALE, L. R., LIU, J., JONAS, J. B., MILEA, D., GEORGE, R., AL-OBEIDAN, S. A., MORI, K., MACGREGOR, S., HEWITT, A. W., GIRKIN, C. A., ZHANG, M., SUNDARESAN, P., VIJAYA, L., MACKEY, D. A., et al. 2015. A common variant near TGFBR3 is associated with primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet*, 24, 3880-92.
- LIBBY, R. T., ANDERSON, M. G., PANG, I. H., ROBINSON, Z. H., SAVINOVA, O. V., COSMA, I. M., SNOW, A., WILSON, L. A., SMITH, R. S., CLARK, A. F. & JOHN, S. W. 2005. Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Vis Neurosci*, 22, 637-48.
- LIN, M. M., CIOLINO, J. B. & PASQUALE, L. R. 2017. Novel Glaucoma Drug Delivery Devices. *Int Ophthalmol Clin*, 57, 57-71.
- LIN, Y., LIU, T., LI, J., YANG, J., DU, Q., WANG, J., YANG, Y., LIU, X., FAN, Y., LU, F., CHEN, Y., PU, Y., ZHANG, K., HE, X. & YANG, Z. 2008. A genome-wide scan maps a novel autosomal dominant juvenile-onset open-angle glaucoma locus to 2p15-16. *Mol Vis*, 14, 739-44.
- LIU, B. & HONG, J. S. 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for

- therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*, 304, 1-7.
- LOMA, P., GUZMAN-ARANGUEZ, A., PEREZ DE LARA, M. J. & PINTOR, J. 2015. Diadenosine tetraphosphate improves adrenergic anti-glaucomatous drug delivery and efficiency. *Exp Eye Res*, 134, 141-7.
- LUNTZ, M. H., FLIEGLER, R. D. & MASTROBATTISTA, J. 1996. Subconjunctival THC:YAG laser sclerostomy under a partial thickness flap. *Eur J Ophthalmol*, 6, 268-72.
- MABUCHI, F., AIHARA, M., MACKEY, M. R., LINDSEY, J. D. & WEINREB, R. N. 2003. Optic nerve damage in experimental mouse ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 4321-30.
- MABUCHI, F., AIHARA, M., MACKEY, M. R., LINDSEY, J. D. & WEINREB, R. N. 2004. Regional optic nerve damage in experimental mouse glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 4352-8.
- MALMSJO, M., HOU, M., PENDERGAST, W., ERLINGE, D. & EDVINSSON, L. 2003. Potent P2Y6 receptor mediated contractions in human cerebral arteries. *BMC Pharmacol*, 3, 4.
- MAMEDOVA, L. K., JOSHI, B. V., GAO, Z. G., VON KUGELGEN, I. & JACOBSON, K. A. 2004. Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y6 nucleotide receptors. *Biochem Pharmacol*, 67, 1763-70.
- MAMINISHKIS, A., JALICKEE, S., BLAUG, S. A., RYMER, J., YERXA, B. R., PETERSON, W. M. & MILLER, S. S. 2002. The P2Y(2) receptor agonist INS37217 stimulates RPE fluid transport in vitro and retinal reattachment in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 3555-66.
- MANNI, G., LAMBIASE, A., CENTOFANTI, M., MATTEI, E., DE GREGORIO, A., ALOE, L. & DE FEO, G. 1996. Histopathological evaluation of retinal damage during intraocular hypertension in rabbit: involvement of ganglion cells and nerve fiber layer. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234 Suppl 1, S209-13.
- MARKOVSKAYA, A., CROOKE, A., GUZMAN-ARANGUEZ, A. I., PERAL, A., ZIGANSHIN, A. U. & PINTOR, J. 2008. Hypotensive effect of UDP on intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol*, 579, 93-7.
- MARTIN-GIL, A., DE LARA, M. J., CROOKE, A., SANTANO, C., PERAL, A. & PINTOR, J. 2012. Silencing of P2Y(2) receptors reduces intraocular pressure in New Zealand rabbits. *Br J Pharmacol*, 165, 1163-72.
- MARTINEZ-AGUILA, A., FONSECA, B., BERGUA, A. & PINTOR, J. 2013. Melatonin analogue agomelatine reduces rabbit's intraocular pressure in normotensive and hypertensive conditions. *Eur J Pharmacol*, 701, 213-7.
- MARTINEZ-AGUILA, A., FONSECA, B., PEREZ DE LARA, M. J. & PINTOR, J. 2016. Effect of Melatonin and 5-Methoxycarbonylamino-N-Acetyltryptamine on the Intraocular Pressure of Normal and Glaucomatous Mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 357, 293-9.
- MASLAND, R. H. 2001. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 431-6.
- MAURICE, D. M. 1980. Structures and fluids involved in the penetration of topically applied drugs. *Int Ophthalmol Clin*, 20, 7-20.
- MAYO, C., REN, R., RICH, C., STEPP, M. A. & TRINKAUS-RANDALL, V. 2008. Regulation by P2X7: epithelial migration and stromal organization in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 4384-91.
- MCLAREN, J. W. 2009. Measurement of aqueous humor flow. *Exp Eye Res*, 88, 641-7.
- MCMENAMIN, P. G. 1991. A quantitative study of the prenatal development of the aqueous outflow system in the human eye. *Exp Eye Res*, 53, 507-17.
- MCMONNIES, C. 2015. An examination of the hypothesis that intraocular pressure elevation episodes can have prognostic significance in glaucoma suspects. *J Optom*, 8, 223-31.
- MEDIERO, A., PERAL, A. & PINTOR, J. 2006. Dual roles of diadenosine polyphosphates in corneal epithelial

- cell migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 4500-6.
- MEEKINS, J. M., ESHAR, D., RANKIN, A. J. & HENNINGSON, J. N. 2016. Clinical and histologic description of ocular anatomy in captive black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Vet Ophthalmol*, 19, 110-6.
- MERMOUD, A., BAERVELDT, G., MICKLER, D. S., WU, G. S. & RAO, N. A. 1994. Animal model for uveitic glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 232, 553-60.
- MEYER, C. H., HOTTA, K., PETERSON, W. M., TOTH, C. A. & JAFFE, G. J. 2002. Effect of INS37217, a P2Y(2) receptor agonist, on experimental retinal detachment and electroretinogram in adult rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 3567-74.
- MEYER, W. 1885. von Langenbeck's. *Archiv für klinische Chirurgie*, 31, 495-525.
- MIRAS-PORTUGAL, M. T., GUALIX, J., MATEO, J., DIAZ-HERNANDEZ, M., GOMEZ-VILLAFUERTES, R., CASTRO, E. & PINTOR, J. 1999. Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism. *Prog Brain Res*, 120, 397-409.
- MITCHELL, C. H. 2001. Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space. *J Physiol*, 534, 193-202.
- MITCHELL, C. H., CARRE, D. A., MCGLINN, A. M., STONE, R. A. & CIVAN, M. M. 1998. A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7174-8.
- MONEMI, S., SPAETH, G., DASILVA, A., POPINCHALK, S., ILITCHEV, E., LIEBMANN, J., RITCH, R., HEON, E., CRICK, R. P., CHILD, A. & SARFARAZI, M. 2005. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum Mol Genet*, 14, 725-33.
- MORENO, M., RIOS, M. C., ALBA, C., DIAZ, F., VILLENA, A., FIGUEROA-ORTIZ, L. C. & GARCIA-CAMPOS, J. 2014. Morphological and morphometric changes in rat optic nerve microvessels in a glaucoma experimental model. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 89, 471-6.
- MORENO, M. C., MARCOS, H. J., OSCAR CROXATTO, J., SANDE, P. H., CAMPANELLI, J., JALIFFA, C. O., BENOZZI, J. & ROSENSTEIN, R. E. 2005. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res*, 81, 71-80.
- MOROI, S. E., LARK, K. K., SIEVING, P. A., NOURI-MAHDAVI, K., SCHLOTZER-SCHREHARDT, U., KATZ, G. J. & RITCH, R. 2003. Long anterior zonules and pigment dispersion. *Am J Ophthalmol*, 136, 1176-8.
- MORRISON, J. C., MOORE, C. G., DEPPMEIER, L. M., GOLD, B. G., MESHUL, C. K. & JOHNSON, E. C. 1997. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res*, 64, 85-96.
- MOSAED, S., LIU, J. H. & WEINREB, R. N. 2005. Correlation between office and peak nocturnal intraocular pressures in healthy subjects and glaucoma patients. *Am J Ophthalmol*, 139, 320-4.
- MURAKAMI, T., FUJIHARA, T., NAKAMURA, M. & NAKATA, K. 2003. P2Y(2) receptor elicits PAS-positive glycoprotein secretion from rabbit conjunctival goblet cells in vivo. *J Ocul Pharmacol Ther*, 19, 345-52.
- MUSCH, D. C., GILLESPIE, B. W., LICHTER, P. R., NIZIOL, L. M., JANZ, N. K. & INVESTIGATORS, C. S. 2009. Visual field progression in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study the impact of treatment and other baseline factors. *Ophthalmology*, 116, 200-7.
- NEARY, J. T., MCCARTHY, M., KANG, Y. & ZUNIGA, S. 1998. Mitogenic signaling from P1 and P2 purinergic receptors to mitogen-activated protein kinase in human fetal astrocyte cultures. *Neurosci Lett*, 242, 159-62.
- NEUFELD, A. H. 1999. Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in



- glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 117, 1050-6.
- NEUFELD, A. H., KAWAI, S., DAS, S., VORA, S., GACHIE, E., CONNOR, J. R. & MANNING, P. T. 2002. Loss of retinal ganglion cells following retinal ischemia: the role of inducible nitric oxide synthase. *Exp Eye Res*, 75, 521-8.
- NICHOLAS, R. A., WATT, W. C., LAZAROWSKI, E. R., LI, Q. & HARDEN, K. 1996. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol*, 50, 224-9.
- NICHOLS, K. K., YERXA, B. & KELLERMAN, D. J. 2004. Diquafosol tetrasodium: a novel dry eye therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, 13, 47-54.
- NICKE, A., BAUMERT, H. G., RETTINGER, J., EICHELE, A., LAMBRECHT, G., MUTSCHLER, E. & SCHMALZING, G. 1998. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J*, 17, 3016-28.
- NISHIDA, M., SATO, Y., UEMURA, A., NARITA, Y., TOZAKI-SAITOH, H., NAKAYA, M., IDE, T., SUZUKI, K., INOUE, K., NAGAO, T. & KUROSE, H. 2008. P2Y6 receptor-Galpha12/13 signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. *EMBO J*, 27, 3104-15.
- NISHIMURA, A., SUNGGIP, C., ODA, S., NUMAGA-TOMITA, T., TSUDA, M. & NISHIDA, M. 2017. Purinergic P2Y receptors: Molecular diversity and implications for treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther*, 180, 113-128.
- NOECKER, R. J. 2006. The management of glaucoma and intraocular hypertension: current approaches and recent advances. *Ther Clin Risk Manag*, 2, 193-206.
- NORTH, R. A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82, 1013-67.
- OLIVIER, K. N., BENNETT, W. D., HOHNEKER, K. W., ZEMAN, K. L., EDWARDS, L. J., BOUCHER, R. C. & KNOWLES, M. R. 1996. Acute safety and effects on mucociliary clearance of aerosolized uridine 5'-triphosphate +/- amiloride in normal human adults. *Am J Respir Crit Care Med*, 154, 217-23.
- ORTEGA, F., PEREZ-SEN, R., DELICADO, E. G. & TERESA MIRAS-PORTUGAL, M. 2011. ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y13 and P2X7 receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology*, 61, 1210-21.
- PARIKH, R. S., PARIKH, S. R., NAVIN, S., ARUN, E. & THOMAS, R. 2008. Practical approach to medical management of glaucoma. *Indian J Ophthalmol*, 56, 223-30.
- PASCOLINI, D. & MARIOTTI, S. P. 2012. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol*, 96, 614-8.
- PEASE, M. E., CONE FE FAU - GELMAN, S., GELMAN S FAU - SON, J. L., SON JL FAU - QUIGLEY, H. A. & QUIGLEY, H. A. 2011. Calibration of the TonoLab tonometer in mice with spontaneous or experimental glaucoma.
- PENDERGAST, W., YERXA, B. R., DOUGLASS, J. G., 3RD, SHAVER, S. R., DOUGHERTY, R. W., REDICK, C. C., SIMS, I. F. & RIDEOUT, J. L. 2001. Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5'-polyphosphates. *Bioorg Med Chem Lett*, 11, 157-60.
- PERAL, A., GALLAR, J. & PINTOR, J. 2009. Adenine nucleotide effect on intraocular pressure: Involvement of the parasympathetic nervous system. *Exp Eye Res*, 89, 63-70.
- PERAL, A., LOMA, P., YERXA, B. & PINTOR, J. 2008. Topical application of nucleotides increase lysozyme levels in tears. *Clin Ophthalmol*, 2, 261-7.
- PEREZ DE LARA, M. J., GUZMAN-ARANGUEZ, A., GOMEZ-VILLAFUERTES, R., GUALIX, J., MIRAS-PORTUGAL, M. T. & PINTOR, J. 2018. Increased Ap4A levels and ecto-nucleotidase activity in

- glaucomatous mice retina. *Purinergic Signal*, 14, 259-270.
- PEREZ DE LARA, M. J. & PINTOR, J. 2015. Presence and release of ATP from the retina in an Alzheimer's disease model. *J Alzheimers Dis*, 43, 177-81.
- PEREZ DE LARA, M. J., SANTANO, C., GUZMAN-ARANGUEZ, A., VALIENTE-SORIANO, F. J., AVILES-TRIGUEROS, M., VIDAL-SANZ, M., DE LA VILLA, P. & PINTOR, J. 2014. Assessment of inner retina dysfunction and progressive ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *Exp Eye Res*, 122, 40-9.
- PERKINS, E. S. 1957. Influence of the fifth cranial nerve on the intra-ocular pressure of the rabbit eye. *Br J Ophthalmol*, 41, 257-300.
- PINTOR, J. 2003. [Nucleotides as a new alternative for the treatment of ocular hypertension]. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 78, 295-6.
- PINTOR, J. 2011. Commentary : Why are such high concentrations of nucleotides in the lens? *Purinergic Signal*, 7, 169-70.
- PINTOR, J., BAUTISTA, A., CARRACEDO, G. & PERAL, A. 2004a. UTP and diadenosine tetraphosphate accelerate wound healing in the rabbit cornea. *Ophthalmic Physiol Opt*, 24, 186-93.
- PINTOR, J., CARRACEDO, G., ALONSO, M. C., BAUTISTA, A. & PERAL, A. 2002a. Presence of diadenosine polyphosphates in human tears. *Pflugers Arch*, 443, 432-6.
- PINTOR, J., DIAZ-REY, M. A. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 1993. Ap4A and ADP-beta-S binding to P2 purinoceptors present on rat brain synaptic terminals. *Br J Pharmacol*, 108, 1094-9.
- PINTOR, J. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 1995a. A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes. *Br J Pharmacol*, 115, 895-902.
- PINTOR, J. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 1995b. P2 purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system. *Gen Pharmacol*, 26, 229-35.
- PINTOR, J., PELAEZ, T. & PERAL, A. 2004b. Adenosine tetraphosphate, Ap4, a physiological regulator of intraocular pressure in normotensive rabbit eyes. *J Pharmacol Exp Ther*, 308, 468-73.
- PINTOR, J., PERAL, A., HOYLE, C. H., REDICK, C., DOUGLASS, J., SIMS, I. & YERXA, B. 2002b. Effects of diadenosine polyphosphates on tear secretion in New Zealand white rabbits. *J Pharmacol Exp Ther*, 300, 291-7.
- PINTOR, J., PERAL, A., PELAEZ, T., MARTIN, S. & HOYLE, C. H. 2003. Presence of diadenosine polyphosphates in the aqueous humor: their effect on intraocular pressure. *J Pharmacol Exp Ther*, 304, 342-8.
- PINTOR, J., ROTLLAN, P., TORRES, M. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 1992. Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal Biochem*, 200, 296-300.
- PINTOR, J., SANCHEZ-NOGUEIRO, J., IRAZU, M., MEDIERO, A., PELAEZ, T. & PERAL, A. 2004c. Immunolocalisation of P2Y receptors in the rat eye. *Purinergic Signal*, 1, 83-90.
- PODOS, S. M., MINAS, T. F. & MACRI, F. J. 1968. A new instrument to measure episcleral venous pressure. Comparison of normal eyes and eyes with primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 80, 209-13.
- PROVIS, J. M., PENFOLD, P. L., EDWARDS, A. J. & VAN DRIEL, D. 1995. Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the glia limitans. *Glia*, 14, 243-56.
- QUIGLEY, H. A. 1983. Experimental glaucoma damage mechanism. *Arch Ophthalmol*, 101, 1301-2.
- QUIGLEY, H. A. 2011. Glaucoma. *Lancet*, 377, 1367-77.
- QUIGLEY, H. A. & BROMAN, A. T. 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*, 90, 262-7.
- QUIGLEY, H. A. & VITALE, S. 1997. Models of open-angle glaucoma prevalence and

- incidence in the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38, 83-91.
- RAIBON, E., SAUVE, Y., CARTER, D. A. & GAILLARD, F. 2002. Microglial changes accompanying the promotion of retinal ganglion cell axonal regeneration into peripheral nerve grafts. *J Neurocytol*, 31, 57-71.
- RALEVIC, V. & BURNSTOCK, G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50, 413-92.
- RAO, V. P. & EPSTEIN, D. L. 2007. Rho GTPase/Rho kinase inhibition as a novel target for the treatment of glaucoma. *BioDrugs*, 21, 167-77.
- REDDY, V. N., GIBLIN, F. J., LIN, L. R. & CHAKRAPANI, B. 1998. The effect of aqueous humor ascorbate on ultraviolet-B-induced DNA damage in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39, 344-50.
- REIGADA, D., LU, W., ZHANG, M. & MITCHELL, C. H. 2008. Elevated pressure triggers a physiological release of ATP from the retina: Possible role for pannexin hemichannels. *Neuroscience*, 157, 396-404.
- REIGADA, D., LU, W., ZHANG, X., FRIEDMAN, C., PENDRAK, K., MCGLINN, A., STONE, R. A., LATIES, A. M. & MITCHELL, C. H. 2005. Degradation of extracellular ATP by the retinal pigment epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289, C617-24.
- REISS, G. R., LEE, D. A., TOPPER, J. E. & BRUBAKER, R. F. 1984. Aqueous humor flow during sleep. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25, 776-8.
- REITSAMER, H. A., KIEL, J. W., HARRISON, J. M., RANSOM, N. L. & MCKINNON, S. J. 2004. Tonopen measurement of intraocular pressure in mice. *Exp Eye Res*, 78, 799-804.
- RELVAS, L. J., BOUFFIOUX, C., MARCET, B., COMMUNI, D., MAKHOUL, M., HORCKMANS, M., BLERO, D., BRUYNS, C., CASPERS, L., BOEYNAEMS, J. M. & WILLERMAIN, F. 2009. Extracellular nucleotides and interleukin-8 production by ARPE cells: potential role of danger signals in blood-retinal barrier activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 1241-6.
- RITCH, R. 1994. Exfoliation syndrome-the most common identifiable cause of open-angle glaucoma. *J Glaucoma*, 3, 176-7.
- ROBERTSON, S. J. & EDWARDS, F. A. 1998. ATP and glutamate are released from separate neurones in the rat medial habenula nucleus: frequency dependence and adenosine-mediated inhibition of release. *J Physiol*, 508 ( Pt 3), 691-701.
- RODRIGUES-NEVES, A. C., AIRES, I. D., VINDEIRINHO, J., BOIA, R., MADEIRA, M. H., GONCALVES, F. Q., CUNHA, R. A., SANTOS, P. F., AMBROSIO, A. F. & SANTIAGO, A. R. 2018. Elevated Pressure Changes the Purinergic System of Microglial Cells. *Front Pharmacol*, 9, 16.
- RODRIGUEZ DEL CASTILLO, A., TORRES, M., DELICADO, E. G. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 1988. Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J Neurochem*, 51, 1696-703.
- ROHEN, J. W., LUTJEN, E. & BARANY, E. 1967. The relation between the ciliary muscle and the trabecular meshwork and its importance for the effect of miotics on aqueous outflow resistance. A study in two contrasting monkey species, *Macaca irus* and *Cercopithecus aethiops*. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*, 172, 23-47.
- ROJAS, B., GALLEGO, B. I., RAMIREZ, A. I., SALAZAR, J. J., DE HOZ, R., VALIENTE-SORIANO, F. J., AVILES-TRIGUEROS, M., VILLEGAS-PEREZ, M. P., VIDAL-SANZ, M., TRIVINO, A. & RAMIREZ, J. M. 2014. Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J Neuroinflammation*, 11, 133.
- ROY CHOWDHURY, U., HANN, C. R., STAMER, W. D. & FAUTSCH, M. P. 2015. Aqueous humor outflow: dynamics



- and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56, 2993-3003.
- SALEH, M., NAGARAJU, M. & PORCIATTI, V. 2007. Longitudinal evaluation of retinal ganglion cell function and IOP in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 4564-72.
- SALINAS-NAVARRO, M., ALARCON-MARTINEZ, L., VALIENTE-SORIANO, F. J., ORTIN-MARTINEZ, A., JIMENEZ-LOPEZ, M., AVILES-TRIGUEROS, M., VILLEGAS-PEREZ, M. P., DE LA VILLA, P. & VIDAL-SANZ, M. 2009. Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol Vis*, 15, 2578-98.
- SANDERSON, J., DARTT, D. A., TRINKAUS-RANDALL, V., PINTOR, J., CIVAN, M. M., DELAMERE, N. A., FLETCHER, E. L., SALT, T. E., GROSCHE, A. & MITCHELL, C. H. 2014. Purines in the eye: recent evidence for the physiological and pathological role of purines in the RPE, retinal neurons, astrocytes, Muller cells, lens, trabecular meshwork, cornea and lacrimal gland. *Exp Eye Res*, 127, 270-9.
- SAPPINGTON, R. M., CARLSON, B. J., CRISH, S. D. & CALKINS, D. J. 2010. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 207-16.
- SAVINOVA, O. V., SUGIYAMA, F., MARTIN, J. E., TOMAREV, S. I., PAIGEN, B. J., SMITH, R. S. & JOHN, S. W. 2001. Intraocular pressure in genetically distinct mice: an update and strain survey. *BMC Genet*, 2, 12.
- SAWADA, K., HIRAOKA, M. & OHGURO, H. 2016. Effect of Antiglaucoma Medicine on Intraocular Pressure in DBA/2J Mice. *Ophthalmic Res*, 55, 205-11.
- SCHEIE, H. G. & CAMERON, J. D. 1981. Pigment dispersion syndrome: a clinical study. *Br J Ophthalmol*, 65, 264-9.
- SCHLUTER, H., OFFERS, E., BRUGGEMANN, G., VAN DER GIET, M., TEPEL, M., NORDHOFF, E., KARAS, M., SPIEKER, C., WITZEL, H. & ZIDEK, W. 1994. Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure. *Nature*, 367, 186-8.
- SCHMUCKER, C. & SCHAEFFEL, F. 2004. A paraxial schematic eye model for the growing C57BL/6 mouse. *Vision Res*, 44, 1857-67.
- SCHOLZ, M., BUDER, T., SEEGER, S., ADAMEK, E., BECKER, C. M. & LUTJEN-DRECOLL, E. 2008. Dependency of intraocular pressure elevation and glaucomatous changes in DBA/2J and DBA/2J-Rj mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 613-21.
- SCHUETTAUF, F., QUINTO, K., NASKAR, R. & ZURAKOWSKI, D. 2002. Effects of anti-glaucoma medications on ganglion cell survival: the DBA/2J mouse model. *Vision Res*, 42, 2333-7.
- SHAHIDULLAH, M. & WILSON, W. S. 1997. Mobilisation of intracellular calcium by P2Y2 receptors in cultured, non-transformed bovine ciliary epithelial cells. *Curr Eye Res*, 16, 1006-16.
- SHAREEF, S. R., GARCIA-VALENZUELA, E., SALIERNO, A., WALSH, J. & SHARMA, S. C. 1995. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res*, 61, 379-82.
- SHELL, J. W. 1982. Pharmacokinetics of topically applied ophthalmic drugs. *Surv Ophthalmol*, 26, 207-18.
- SIDDIQUI, Y., TEN HULZEN, R. D., CAMERON, J. D., HODGE, D. O. & JOHNSON, D. H. 2003. What is the risk of developing pigmentary glaucoma from pigment dispersion syndrome? *Am J Ophthalmol*, 135, 794-9.
- SILBERBERG, S. D., CHANG, T. H. & SWARTZ, K. J. 2005. Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol*, 125, 347-59.
- SMITH, M. A., PLYLER, E. S., DENGLER-CRISH, C. M., MEIER, J. & CRISH, S. D. 2018. Nodes of Ranvier in Glaucoma. *Neuroscience*, 390, 104-118.
- SMITH, R. S., JOHN, S. W., ZABELETA, A., DAVISSON, M. T., HAWES, N. L. &

- CHANG, B. 2000. The *bst* locus on mouse chromosome 16 is associated with age-related subretinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 2191-5.
- SNEDDON, P., WESTFALL, T. D., TODOROV, L. D., TODOROVA, S. M., WESTFALL, D. P., NICKEL, P. & KENNEDY, C. 2000. The effect of P2 receptor antagonists and ATPase inhibition on sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens. *Br J Pharmacol*, 129, 1089-94.
- SOLINI, A., CHIOZZI, P., MORELLI, A., PASSARO, A., FELLIN, R. & DI VIRGILIO, F. 2003. Defective P2Y purinergic receptor function: A possible novel mechanism for impaired glucose transport. *J Cell Physiol*, 197, 435-44.
- SOMMER, A. & TIELSCH, J. M. 1996. Risk factors for open-angle glaucoma: the Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol*, 114, 235.
- SOTO, D., COMES, N., FERRER, E., MORALES, M., ESCALADA, A., PALES, J., SOLSONA, C., GUAL, A. & GASULL, X. 2004. Modulation of aqueous humor outflow by ionic mechanisms involved in trabecular meshwork cell volume regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 3650-61.
- SOTO, D., PINTOR, J., PERAL, A., GUAL, A. & GASULL, X. 2005. Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility. *J Pharmacol Exp Ther*, 314, 1042-51.
- SPERLAGH, B. & ILLES, P. 2007. Purinergic modulation of microglial cell activation. *Purinergic Signal*, 3, 117-27.
- SPRINGELKAMP, H., MISHRA, A., HYSI, P. G., GHARAHKHANI, P., HOHN, R., KHOR, C. C., COOKE BAILEY, J. N., LUO, X., RAMDAS, W. D., VITHANA, E., KOH, V., YAZAR, S., XU, L., FORWARD, H., KEARNS, L. S., AMIN, N., IGLESIAS, A. I., SIM, K. S., VAN LEEUWEN, E. M., DEMIRKAN, A., VAN DER LEE, S., LOON, S. C., RIVADENEIRA, F., NAG, A., SANFILIPPO, P. G., SCHILLERT, A., DE JONG, P. T., OOSTRA, B. A., UITTERLINDEN, A. G., HOFMAN, A., CONSORTIUM, N., ZHOU, T., BURDON, K. P., SPECTOR, T. D., LACKNER, K. J., SAW, S. M., VINGERLING, J. R., TEO, Y. Y., PASQUALE, L. R., WOLFS, R. C., LEMIJ, H. G., TAI, E. S., JONAS, J. B., CHENG, C. Y., AUNG, T., JANSONIUS, N. M., KLAVER, C. C., CRAIG, J. E., YOUNG, T. L., HAINES, J. L., MACGREGOR, S., MACKEY, D. A., PFEIFFER, N., WONG, T. Y., WIGGS, J. L., HEWITT, A. W., VAN DUIN, C. M. & HAMMOND, C. J. 2015. Meta-analysis of Genome-Wide Association Studies Identifies Novel Loci Associated With Optic Disc Morphology. *Genet Epidemiol*, 39, 207-16.
- STEFUL, J., HORTNER, M., GHOSH, M., SCHAUENSTEIN, K., RINNER, I., WOLFLER, A., SEMMLER, J. & LIEBMANN, P. M. 2001. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res*, 30, 243-7.
- STOILLOV, I., AKARSU, A. N. & SARFARAZI, M. 1997. Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet*, 6, 641-7.
- STRUEBING, F. L. & GEISERT, E. E. 2015. What Animal Models Can Tell Us About Glaucoma. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 134, 365-80.
- SUGIYAMA, T., OKU, H., KOMORI, A. & IKEDA, T. 2006. Effect of P2X7 receptor activation on the retinal blood velocity of diabetic rabbits. *Arch Ophthalmol*, 124, 1143-9.
- SULLIVAN, D. M., ERB, L., ANGLADE, E., WEISMAN, G. A., TURNER, J. T. & CSAKY, K. G. 1997. Identification and characterization of P2Y2 nucleotide receptors in human retinal pigment epithelial cells. *J Neurosci Res*, 49, 43-52.
- SUNAHARA, R. K., DESSAUER, C. W. & GILMAN, A. G. 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl

- cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36, 461-80.
- TAKASAKI, J., KAMOHARA, M., SAITO, T., MATSUMOTO, M., MATSUMOTO, S., OHISHI, T., SOGA, T., MATSUSHIME, H. & FURUICHI, K. 2001. Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y(1) receptor. *Mol Pharmacol*, 60, 432-9.
- TANIHARA, H., INOUE, T., YAMAMOTO, T., KUWAYAMA, Y., ABE, H., FUKUSHIMA, A., SUGANAMI, H., ARAIE, M. & GROUP, K. C. S. 2016. One-year clinical evaluation of 0.4% ripasudil (K-115) in patients with open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Acta Ophthalmol*, 94, e26-34.
- THAM, Y. C., LI, X., WONG, T. Y., QUIGLEY, H. A., AUNG, T. & CHENG, C. Y. 2014. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 121, 2081-90.
- THOMSON, P. A., WRAY, N. R., THOMSON, A. M., DUNBAR, D. R., GRASSIE, M. A., CONDIE, A., WALKER, M. T., SMITH, D. J., PULFORD, D. J., MUIR, W., BLACKWOOD, D. H. & PORTEOUS, D. J. 2005. Sex-specific association between bipolar affective disorder in women and GPR50, an X-linked orphan G protein-coupled receptor. *Mol Psychiatry*, 10, 470-8.
- THRELKELD, A. B., HERTZMARK, E., STURM, R. T., EPSTEIN, D. L. & ALLINGHAM, R. R. 1996. Comparative study of the efficacy of argon laser trabeculoplasty for exfoliation and primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma*, 5, 311-6.
- TOKU, K., TANAKA, J., YANO, H., DESAKI, J., ZHANG, B., YANG, L., ISHIHARA, K., SAKANAKA, M. & MAEDA, N. 1998. Microglial cells prevent nitric oxide-induced neuronal apoptosis in vitro. *J Neurosci Res*, 53, 415-25.
- TRIVIÑO CASADO, A., RAMÍREZ SEBASTIÁN, J.M., GARCÍA SÁNCHEZ, J. 1984. Primeras aportaciones sobre modificaciones vasculares en el disco óptico del conejo tras la provocación del glaucoma experimental con alfa- quimiotripsina. *Arch soc esp oftalmol*, 46, 427-432.
- TURNER, C. M., RAMESH, B., SRAI, S. K., BURNSTOCK, G. & UNWIN, R. J. 2004. Altered ATP-sensitive P2 receptor subtype expression in the Han:SPRD cy/+ rat, a model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Cells Tissues Organs*, 178, 168-79.
- URCOLA, J. H., HERNANDEZ, M. & VECINO, E. 2006. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res*, 83, 429-37.
- VAJARANANT, T. S., NAYAK, S., WILENSKY, J. T. & JOSLIN, C. E. 2010. Gender and glaucoma: what we know and what we need to know. *Curr Opin Ophthalmol*, 21, 91-9.
- VIAL, C., ROBERTS, J. A. & EVANS, R. J. 2004. Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci*, 25, 487-93.
- VIDAL-SANZ, M., SALINAS-NAVARRO, M., NADAL-NICOLAS, F. M., ALARCON-MARTINEZ, L., VALIENTE-SORIANO, F. J., DE IMPERIAL, J. M., AVILES-TRIGUEROS, M., AGUDO-BARRIUSO, M. & VILLEGAS-PEREZ, M. P. 2012. Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res*, 31, 1-27.
- VILHARDT, F. 2005. Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 17-21.
- VON KUGELGEN, I. 2006. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther*, 110, 415-32.
- WALDO, G. L. & HARDEN, T. K. 2004. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol*, 65, 426-36.
- WANG, J. W., CHEN, S. D., ZHANG, X. L. & JONAS, J. B. 2016. Retinal Microglia in Glaucoma. *J Glaucoma*, 25, 459-65.
- WEBER, A. J. & ZELENACK, D. 2001. Experimental glaucoma in the primate

- induced by latex microspheres. *J Neurosci Methods*, 111, 39-48.
- WEBERS, C. A., BECKERS, H. J., NUIJTS, R. M. & SCHOUTEN, J. S. 2008. Pharmacological management of primary open-angle glaucoma: second-line options and beyond. *Drugs Aging*, 25, 729-59.
- WEINREB, R. N., TORIS, C. B., GABELT, B. T., LINDSEY, J. D. & KAUFMAN, P. L. 2002. Effects of prostaglandins on the aqueous humor outflow pathways. *Surv Ophthalmol*, 47 Suppl 1, S53-64.
- WIGGS, J. L. & PASQUALE, L. R. 2017. Genetics of glaucoma. *Hum Mol Genet*, 26, R21-R27.
- WIHLBORG, A. K., BALOGH, J., WANG, L., BORNA, C., DOU, Y., JOSHI, B. V., LAZAROWSKI, E., JACOBSON, K. A., ARNER, A. & ERLINGE, D. 2006. Positive inotropic effects by uridine triphosphate (UTP) and uridine diphosphate (UDP) via P2Y2 and P2Y6 receptors on cardiomyocytes and release of UTP in man during myocardial infarction. *Circ Res*, 98, 970-6.
- WILLIAMS, M. & JARVIS, M. F. 2000. Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. *Biochem Pharmacol*, 59, 1173-85.
- WOLDEMUSSIE, E., RUIZ, G., WIJONO, M. & WHEELER, L. A. 2001. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 2849-55.
- WONG, T. Y., LOON, S. C. & SAW, S. M. 2006. The epidemiology of age related eye diseases in Asia. *Br J Ophthalmol*, 90, 506-11.
- WYMAN, M. & KETRING, K. 1976. Congenital glaucoma in the basset hound: a biologic model. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, 81, OP645-52.
- YADAV, K. S., RAJPUROHIT, R. & SHARMA, S. 2019. Glaucoma: Current treatment and impact of advanced drug delivery systems. *Life Sci*, 221, 362-376.
- YANG, X., LOU, Y., LIU, G., WANG, X., QIAN, Y., DING, J., CHEN, S. & XIAO, Q. 2017. Microglia P2Y6 receptor is related to Parkinson's disease through neuroinflammatory process. *J Neuroinflammation*, 14, 38.
- YITZHAKI, S., SHAINBERG, A., CHEPORKO, Y., VIDNE, B. A., SAGIE, A., JACOBSON, K. A. & HOCHHAUSER, E. 2006. Uridine-5'-triphosphate (UTP) reduces infarct size and improves rat heart function after myocardial infarct. *Biochem Pharmacol*, 72, 949-55.
- YU, M., LIN, C., WEINREB, R. N., LAI, G., CHIU, V. & LEUNG, C. K. 2016. Risk of Visual Field Progression in Glaucoma Patients with Progressive Retinal Nerve Fiber Layer Thinning: A 5-Year Prospective Study. *Ophthalmology*, 123, 1201-10.
- ZAMECNIK, A. G. M. A. P. C. 1992. *Dinucleoside Poluphosphates-An introduction.*, CRC Press.
- ZHAN, G. L., MIRANDA, O. C. & BITO, L. Z. 1992. Steroid glaucoma: corticosteroid-induced ocular hypertension in cats. *Exp Eye Res*, 54, 211-8.
- ZHANG, X., TENG, L., LI, A., DU, S., ZHU, Y. & GE, J. 2007. The clinical outcomes of three surgical managements on primary angle-closure glaucoma. *Yan Ke Xue Bao*, 23, 65-74.
- ZHU, W., JAIN, A., GRAMLICH, O. W., TUCKER, B. A., SHEFFIELD, V. C. & KUEHN, M. H. 2017. Restoration of Aqueous Humor Outflow Following Transplantation of iPSC-Derived Trabecular Meshwork Cells in a Transgenic Mouse Model of Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 58, 2054-2062.



# CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA

## CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA DESARROLLADA A PARTIR DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

### Artículos publicados:

- **Begoña Fonseca**, Alejandro Martínez-Águila, María Jesús Pérez de Lara, M. Teresa Miras-Portugal, Rosa Gómez-Villafuertes, Jesús Pintor. *Changes in P2Y purinergic receptor expression in the ciliary body in a murine model of glaucoma. Frontiers in Pharmacology published: 10 Oct 2017 doi: 10.3389/fphar.2017.00719.*
- **Begoña Fonseca**, Alejandro Martínez-Águila, María Jesús Pérez de Lara, Jesús Pintor. *Diadenosine tetraphosphate as a potential therapeutic nucleotide to treat glaucoma.* Purinergic Signalling. Oct. 2016. DOI 10.1007/s11302-016-9547-y.

### Comunicaciones en congresos:

- **PhDay 2018** presentación en póster “Effect of Ap<sub>4</sub>A on ARPE-19 and microglial cells”, 22 de Noviembre 2018, Madrid, España.
- **CIOCV 2018** presentación en póster “Effect of Ap<sub>4</sub>A on retinal cells ” 28 y 29 de Abril. Braga, Portugal.
- **OPTOM 2018** presentación en póster “Ap<sub>4</sub>A: el efecto a largo plazo y su combinación con los tratamientos actuales para el glaucoma” 13, 14 y 15 de Abril. Madrid, España.
- **PhDay 2017** presentación en póster “El efecto hipotensor del Ap<sub>4</sub>A en un modelo murino de glaucoma”, 15 de Noviembre 2017, Madrid, España.
- **CIOCV 2017** presentación en poster “Ap<sub>4</sub>A in combined therapy with Alphagan® and Timofitol® in a glaucoma model”, 23-24 Abril. Braga, Portugal.
- **ARVO 2014** presentación en póster “Participation of P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> purinergic receptors in the physiopathology of glaucoma”. 4-8 Mayo. Orlando, EEUU.

### Premios:

- **PhDay 2018** presentación en póster “Effect of Ap<sub>4</sub>A on ARPE-19 and microglial cells”, 22 de Noviembre 2018, Madrid, España.

## CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA DESARROLLADA DURANTE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL EN OTROS CAMPOS

### Artículos publicados:

- Hanan Alkozi , Jesús Sánchez-Naves , María Pérez de Lara, Gonzalo Carracedo , **Begoña Fonseca** , Alejandro Martínez-Águila, Jesús Pintor. *Elevated intraocular pressure increases melatonin levels in the aqueous humour. Acta Ophthalmologica* 2016 Sept 6. Doi 10.1111/aos.13253.
- Gonzalo Carracedo, Alba Martin-Gil, **Begoña Fonseca**, Jesús Pintor. *Effect of overnight orthokeratology on conjunctival goblet cells. Contact Lens and Anterior Eye.* 2016 Apr 13. pii: S1367-0484(16)30018-2. doi: 10.1016/j.clae.2016.04.001.
- Alejandro Martínez-Águila, **Begoña Fonseca**, María Jesús Pérez de Lara, Jesús Pintor. *Effect of Melatonin and 5-MCA-NAT on the IOP on normal and glaucomatous mice. JPharm. Exp Ther* 2016 May;357(2):293-9. doi: 10.1124/jpet.115.231456. Epub 2016 Mar 3.
- Ana Guzmán-Aranguez , **Begoña Fonseca**, Gonzalo Carracedo, Alba Martin-Gil , Alejandro Martínez-Águila, and Jesús Pintor . *Dry eye treatment based in contact lens drug delivery: A review.* Eye and contact lenses. 2015 Sep 14.
- **Begoña Fonseca**, Alejandro Martínez-Águila, Miguel Díaz-Hernández, Jesús Pintor. *Diadenosine tetraphosphate contributes to carbachol-induced tear secretion. Purinergic Signalling* November 2014. DOI 10.1007/s11302-014-9434-3
- Alejandro Martínez Águila, **Begoña Fonseca**, Félix Hernández, Miguel Díaz-Hernández, Jesús Ávila y Jesús Pintor. *Tau triggers tear secretion by interacting with muscarinic acetylcholine receptors in New Zealand White Rabbits.* Journal of Alzheimer's Disease February 2014. DOI 10.3233/JAD-132255.
- Ana Guzmán-Aranguez, Concepción Santano, Alba Martín-Gil, **Begoña Fonseca**, and Jesús Pintor. *Nucleotides in the eye: focus on functional aspects and therapeutic perspectives.* JPET 2013 as DOI:10.1124/jpet.112.202473.
- Alejandro Martínez-Águila, **Begoña Fonseca**, Antonio Bergua and Jesús Pintor. *Melatonine Analogue Agomelatine Reduces Intraocular Preassure in Normotensive and Hypertensive Conditions.* European Journal of Pharmacology 701, 2013, 213-217.



### Capítulos en libros:

- Capítulo 23 *Perspectivas futuras en la contactología y aplicaciones tecnológicas*. Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez, Ana Isabel Guzmán Aranguez, **Begoña Fonseca**, Jesús Pintor Just, Alba Martín Gil, José Manuel González Meijome. ISBN 978-84-939656-9-3.

### Comunicaciones en congresos:

- **CIOCV 2018** presentación en póster “Effect of Ap4A on Aquaporin-1 trafficking to plasma membrane in rabbit non-pigmented ciliary epithelial cells: Role of P2Y2 receptor in IOP raise” 28 y 29 de abril, Braga, Portugal.
- **CIOCV 2018** presentación en póster “Melatonin and analogues, potential supplements for glaucoma treatment” 28 y 29 de abril, Braga, Portugal.
- **CIOCV 2018** presentación en póster “Accommodative spasm treated with visual therapy and soft contact lenses” 28 y 29 de abril, Braga, Portugal.
- **OPTOM 2018** presentación en póster “AP4A: El efecto a largo plazo y su combinación con los tratamientos actuales para el glaucoma” 13, 14 y 15 de Abril. Madrid, España.
- **OPTOM 2018** presentación en póster “Efecto de los análogos de melatonina en la secreción lagrimal. uso de lentes de contacto como dispositivos de liberación” 13, 14 y 15 de Abril. Madrid, España.
- **OPTOM 2018** presentación oral “Melatonina y análogos, agentes hipotensores y neuroprotectores retinianos. implicación de los receptores de melatonina en la patología glaucomatosa” 13, 14 y 15 de Abril. Madrid, España.
- **OPTOM 2018** presentación en póster “la activación del receptor TRPV4 induce la liberación de Ap<sub>4</sub>A al humor acuoso” 13, 14 y 15 de Abril. Madrid, España.
- **SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OFATLMOLOGÍA** presentación en póster “Melatonina y análogos, potenciales complementos para el tratamiento del glaucoma” 8 – 10 marzo, Bilbao, España.
- **OPTOM MEETING ACADEMY 2017** presentación en póster “Long-effect of 5-MCA-NAT on the IOP of glaucomatous mice” 12, 13 y 14 de Mayo. Barcelona, España.
- **CIOCV 2017** presentación en póster “Trendelemburg position: a simple method to test glaucomatous hypotensive compounds in a hypertensive condition” 22 y 23 de Abril. Braga, Portugal.
- **CIOCV 2017** presentación en póster “Dynamically stabilized toric soft contact lens fitting for elevated astigmatism in patients with strabismic and nonstrabismic binocular vision disorders” 22 y 23 de Abril. Braga, Portugal.



- **CIOCV 2017** presentación en póster “Activation of trpv4 induces the reléase of diadenosine tetraphosphate in the aqueous humour” 22 y 23 de Abril. Braga, Portugal.
- **CIOCV 2017** presentación en póster “Effect on tear secretion of dinucleotides and melatonin analogues in combined therapy” 22 y 23 de Abril. Braga, Portugal.
- **CIOCV 2017** presentación en póster “Melatonin levels in the aqueous humour: connection with intraocular pressure” 22 y 23 de Abril. Braga, Portugal.
- **CIOCV 2017** presentación en póster “Ap4a in combined therapy with alphagan® and timoftol® in a glaucoma model” 22 y 23 de Abril. Braga, Portugal.
- **ARVO 2016** presentación en póster “The Effect of Preserved Antiglaucoma Eye-drops on Goblet Cells and the Expression of Pro-inflammatory Markers”. 1-5 de Mayo de 2016 Seattle, EEUU.
- **ARVO 2016** presentación en póster “Elevated intraocular pressure increases melatonin levels in the aqueous humour” 1-5 de Mayo de 2016 Seattle, EEUU.
- **CIOCV 2016**, presentación en póster “Evaluation of the protective effect of an artificial tear drops with Aloe Vera in corneal epithelium cells compared to other artificial tear drops” 23 y 24 de Abril. Braga, Portugal.
- **CIOCV 2016**, presentación en póster “Effect of diguanine polyphosphates on tear secretion” 23 y 24 de Abril. Braga, Portugal.
- **CIOCV 2016**, presentación en póster “Effect of melatonin analogues on tear secretion” 23 y 24 de Abril. Braga, Portugal.
- **OPTOM 2016**, presentación oral “Efecto de la ortoqueratología sobre signos y síntomas de ojo seco: comparación entre un grupo de pacientes neófitos y antiguos usuarios de lentes hidrofílicas”, 8-10 Abril 2016, Madrid, España.
- **OPTOM 2016**, presentación en póster “La presión intraocular aumenta los niveles de melatonina en el humor acuoso”, 8-10 Abril 2016, Madrid, España.
- **OPTOM 2016**, presentación en póster “Cambios en la turbidez lagrimal tras el uso de lentes de contacto esclerales y su efecto sobre la calidad visual”, 8-10 Abril 2016, Madrid, España.
- **OPTOM 2016**, presentación en póster “Cambios topográficos tras el porte de lentes de contacto esclerales”, 8-10 Abril 2016, Madrid, España.
- **ARVO 2015**, presentación en póster “Melatonin and its synthesising enzyme increases under ocular hypertension and glaucomatous conditions”. 3-7 de Mayo de 2015 Denver, EEUU.

- **CIOCV 2015**, presentación en póster “Comparaçãõ da pressãõ intraocular medida com Perkins, tonometria sem contato e tonometria, transpalpebral antes e após Cirurgia Refractiva LASIK” 25 y 26 de Abril. Braga, Portugal.
- **CIOCV 2015**, presentación en póster “Efeito da ortoqueratologia nocturna em células caliciformes da conjuntiva” 25 y 26 de Abril. Braga, Portugal.
- **VISER 2014**, presentación oral “Evaluación in vitro e in vivo de la liberación de diadenosin tetrafosfato desde lentes de contacto convencionales” 22 y 23 de Noviembre. Santiago de Compostela, España.
- **VISER 2014**, presentación en póster “¿Son los nucleótidos procedentes del cristalino responsables del desarrollo del glaucoma?”. 22 y 23 de Noviembre. Santiago de Compostela, España.
- **VISER 2014**, presentación oral “Nueva técnica para la visualización de mucinas en las citologías de impresión mediante la microscopía confocal láser”. 22 y 23 de Noviembre. Santiago de Compostela, España.
- **VISER 2014**, presentación oral “El análogo de la melatonina agomelatina reduce la presión intraocular en conejos con tensión normal e hipertensos”. 22 y 23 de Noviembre. Santiago de Compostela, España.
- **VISER 2014**, presentación oral “Estudio comparativo de la integrada de la superficie ocular en pacientes tras cirugía refractiva. LASIK vs PRK. 22 y 23 de Noviembre. Santiago de Compostela, España.
- **SEO 2014**, presentación oral “Evaluación in vitro e in vivo de la liberación de un inductor de la secreción lagrimal mediante lentes de contacto” 1-4 de Octubre, Bilbao, España.
- **CIOCV 2014**, presentación oral “in vitro and in vivo delivery of the secretagogue dinucleotides tetrphosphate from silicone hydrogel soft contact lenses”. 24-25 de Mayo. Braga, Portugal.
- **CIOCV 2014**, presentación oral “Visualization of ocular surface’s mucines by confocal laser scanning microscopy in mucodeficient patients”. 24-25 de Mayo. Braga, Portugal.
- **CIOCV 2014**, presentación oral “Study of ocular surface quality in patients with keratoconus before and after intracorneal ring segments”. 24-25 de Mayo. Braga, Portugal.
- **CIOCV 2014**, presentación en póster “A melatonina e os seus análogos como potenciais hipotensore intraoculare para o tratamento de glaucoma”. 24-25 de Mayo. Braga, Portugal.
- **CIOCV 2014**, presentación en póster “Efeito citotóxico nas células epiteliais da córnea de soluções únicas com Aloé Vera para lentes de contato hidrófilas”. 24-25 de Mayo. Braga, Portugal.

- **ARVO 2014**, presentación en póster “Melatonin, IIR7 and 5-MCA-NAT potentiate adrenergic receptor-mediated ocular hypotensive effects in rabbits: a significance for combination therapy in glaucoma”, 4-8 Mayo, Orlando, EEUU.
- **ARVO 2014**, presentación en póster “Hypotensive effect of melatonin and its analogues in different animals models”, 4-8 Mayo, Orlando, EEUU.
- **ARVO 2014**, presentación en póster “Improving 3D mucin visualization by a new device to make impression Cytology comparing normal and mucodeficient subjects.” 4-8 Mayo, Orlando, EEUU.
- **ARVO 2014**, presentación en póster “Participation of P2Y2 and P2Y6 purinergic receptors in the physio pathology of glaucoma” 4-8 Mayo, Orlando, EEUU.
- **OPTOM 2014**, presentación en póster “Estudio de las células Goblet y su producción mucinica en patologías de la superficie ocular”, 4-6 Abril 2014, Madrid, España.
- **OPTOM 2014**, presentación en póster “efecto de las soluciones de mantenimiento de lentes de contacto blandas con aloe vera sobre el epitelio corneal”, 4-6 Abril 2014, Madrid, España.
- **OPTOM 2014**, presentación en comunicación oral “nueva técnica de microscopía confocal láser en 3D para la visualización de mucinas en las citologías de impresión” 4-6 Abril 2014, Madrid, España.
- **CIOCV 2013**, presentación en póster “Validation of Ap<sub>4</sub>A as a biomarker of dry eye”. 13-14 Abril 2013, Braga, Portugal.
- **CIOCV 2013**, presentación en póster “An overview on nucleotides as an alternative for dry eye treatment”. 13-14 Abril 2013, Braga, Portugal.
- **AOPT 2013**, Scientific Meeting con la comunicación en presentación en póster “Tear secretion induced by Carbachol is mediated by Ap<sub>4</sub>A release”. 7-10 de Febrero de 2013, Alicante, España.
- **AOPT 2013**, Scientific Meeting con la comunicación en presentación en póster “Trafficking of aquaporin-1 is mediated by Ap<sub>4</sub>A in rabbit non pigmented ciliary epithelial cells: Involvement of P2Y<sub>2</sub> receptor in IOP raise”. 7-10 de Febrero de 2013, Alicante, España.
- **AOPT 2013**, Scientific Meeting con la comunicación oral “Melatonin and its analogue 5-MCA-NAT potentiate the Ocular hypotensive effect mediated by adrenergic receptors: significance for Glaucoma treatment”. 7-10 de Febrero de 2013, Alicante, España.

- **AOPT 2013**, Scientific Meeting con la comunicación en presentación en póster “Melatonin analogue agomelatine reduces intraocular pressure in rabbit with normotensive and hypertensive conditions”. 7-10 de Febrero de 2013, Alicante, España.
- **PURINES 2012**, Presentación en póster Adenine Nucleosides and Nucleotides in biomedicine. “Are Lens Nucleotides Responsible of Glaucoma Development?” 31 Mayo-02 Junio. Fukuoka, Japón.
- **ARVO 2011**, Presentación en póster Visionary Genomics. “Activation of TPRV4 induces the release of diadenosine tretraphosphate to de aqueous humour”. 1-6 Mayo, Fort Lauderdale, Florida.

#### **PATENTES:**

- *Uso de compuestos melatoninérgicos para tratar la superficie ocular.* Alejandro Martínez-Águila, **Begoña Fonseca**, Gonzalo Carracedo, Jesús Pintor. Julio 2015.